

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie ed Agro-Alimentari**

**Corso di Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica XXIV ciclo**



## **Identificazione e studio di geni coinvolti nel pathway dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro**

Dottoranda: Dott.ssa Alessandra Iodice

Tutore:

Ch.mo Prof. Antonio Evidente

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Matteo Lorito

Co-tutore

Ch.ma Dott.ssa Maria Cammareri

Anno Accademico 2010/2011

## INDICE

<b>PREMESSA</b>	pag. 4
<b>RIASSUNTO</b>	pag. 6
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1 Metaboliti secondari di pianta e loro impiego	pag. 9
1.2 $\alpha$ -tomatina: caratteristiche strutturali e biochimiche	pag. 17
1.3 Meccanismi d'azione ed attività biologiche dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 19
1.4 Pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 21
1.5 Strategie per incrementare il contenuto dei metaboliti secondari	pag. 25
1.6 Obiettivi del lavoro sperimentale	pag. 28
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	
2.1 Materiale vegetale	pag. 30
2.2 Isolamento e clonaggio del gene <i>CASI</i>	pag. 30
2.3 Analisi di espressione del gene <i>CASI</i> in risposta a stress luminoso	pag. 31
2.4 Isolamento e caratterizzazione strutturale del gene <i>SMT1</i>	pag. 31
2.5 Isolamento e clonaggio del gene <i>CYP51</i>	pag. 32
2.6 Isolamento e clonaggio del gene <i>FK</i>	pag. 33
2.7 Isolamento e clonaggio del gene <i>SMO</i>	pag. 33
2.8 RT-PCR	pag. 34
2.9 Identificazione del gene <i>LeXYL1</i>	pag. 35
2.10 Real Time PCR del gene <i>LeXYL1</i>	pag. 35
2.11 Analisi funzionale del gene <i>LeXYL1</i> : strategia dell'overespressione	pag. 36
2.12 Analisi funzionale del gene <i>LeXYL1</i> : strategia del silenziamento	pag. 37
2.13 Trasformazione della cultivar M82 di pomodoro	pag. 39
2.14 Analisi molecolari delle linee transgeniche	pag. 41
2.15 Analisi morfologiche delle linee transgeniche T <sub>1</sub> - <i>LeXYL1</i>	pag. 41
2.16 Analisi chimiche delle linee transgeniche T <sub>1</sub> - <i>LeXYL1</i>	pag. 42

2.16.1 Estrazione dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 42
2.16.2 Analisi qualitativa e quantitativa degli estratti	pag. 42
2.17 Analisi bioinformatiche	pag. 43
2.18 Analisi statistiche	pag. 44

### 3. RISULTATI

3.1 Studio di geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 45
3.1.1 Isolamento e clonaggio del gene della cicloartenolo sintasi ( <i>CASI</i> )	pag. 45
3.1.2 Isolamento e clonaggio del gene della steol-metiltransferasi 1 ( <i>SMT1</i> )	pag. 48
3.1.3 Isolamento e clonaggio del gene della obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi ( <i>CYP51</i> )	pag. 52
3.1.4 Isolamento e clonaggio del gene della sterol C-14 riduttasi ( <i>FK</i> )	pag. 54
3.1.5 Isolamento e clonaggio del gene della sterol-4 $\alpha$ -metilossidasi ( <i>SMO</i> )	pag. 55
3.1.6 Analisi di espressione dei geni coinvolti nell'anabolismo	pag. 56
3.1.6.1 Studio di espressione delle due isoforme del gene <i>CASI</i>	pag. 56
3.1.6.2 Analisi trascrizionale dei geni <i>SMT1</i> , <i>CYP51</i> , <i>FK</i> e <i>SMO</i>	pag. 58
3.2 Studio del pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 60
3.2.1 Identificazione e studio di espressione del gene <i>LeXYL1</i>	pag. 60
3.2.2 Analisi funzionale del gene <i>LeXYL1</i> : strategia dell'overespressione	pag. 61
3.2.3 Analisi funzionale del gene <i>LeXYL1</i> : strategia del silenziamento	pag. 61
3.2.4 Analisi chimiche del materiale transgenico	pag. 64

### 4. DISCUSSIONE

4.1 Isolamento e clonaggio dei geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 67
4.2 Isolamento e clonaggio dei geni coinvolti nel pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina	pag. 74

5. CONCLUSIONI	pag. 80
----------------	---------

6. BIBLIOGRAFIA	pag. 81
-----------------	---------

## PREMESSA

Le piante producono una vasta gamma di metaboliti che, a dispetto della loro definizione di "secondari", svolgono funzioni fisiologiche e biochimiche molto importanti, agendo soprattutto come barriere di difesa verso funghi, batteri, insetti e nematodi, ma anche garantendo una migliore risposta dell'organismo a fattori di stress abiotico. Le numerose attività biologiche che caratterizzano i metaboliti secondari di origine vegetale hanno determinato, negli ultimi anni, un crescente interesse nei riguardi di questi fitochimici. Non a caso, molti di questi, trovano oggi impiego nel settore farmacologico ed agrochimico, dove vengono utilizzati come principi attivi di prodotti a base naturale da impiegare nel trattamento di patologie umane, oltre che nei programmi agronomici di lotta biologica ed integrata.

In pomodoro, uno dei più importanti metaboliti secondari è rappresentato dal glicoalcaloide steroideo  $\alpha$ -tomatina, costituito da un aglicone, la tomatidina, di natura idrofobica e steroidea, a 27 atomi di carbonio e caratterizzato dalla presenza di un atomo di azoto che ne conferisce proprietà basiche; all'aglicone si lega una catena laterale idrofilica, tetrasaccaridica, costituita da un residuo di galattosio, due di glucosio e uno di xilosio, che prende il nome di licotetraosio.

L' $\alpha$ -tomatina si caratterizza per le sue importanti e numerose attività biologiche, agendo, in pianta, come metabolita di difesa verso un ampio spettro di agenti fitopatogeni, grazie ad un meccanismo d'azione basato, essenzialmente, sull'interazione con le membrane cellulari; inoltre, essa presenta molte proprietà farmacologico-salutistiche come, ad esempio, quella anticolesterolemica, antinfiammatoria e antitumorale. In virtù di queste sue attività biologiche, l' $\alpha$ -tomatina può rientrare nel novero di quei metaboliti secondari di pianta da poter utilizzare sia in campo farmacologico sia agrochimico, soprattutto se si considera che, nonostante si tratti di un glicoalcaloide, la sua tossicità è molto bassa rispetto a quella di analoghi strutturali come la solanina.

Tuttavia, come tutti i metaboliti secondari, anche l' $\alpha$ -tomatina presenta bassi livelli di concentrazione in pianta, quantità, tra l'altro, molto variabili nei diversi tessuti e nei diversi stadi fisiologici. Poiché il fattore limitante per l'uso delle biomolecole su larga scala è rappresentato proprio dalla loro ridotta produzione *in planta*, negli ultimi anni hanno trovato affermazione approcci biotecnologici finalizzati alla possibilità di incrementarne il contenuto nelle matrici organiche di partenza. Ognuna di queste strategie presuppone la conoscenza del pathway metabolico su cui si intende intervenire, e quindi degli enzimi chiave in esso coinvolti e dei geni per essi codificanti. A dispetto delle numerose conoscenze relative alle attività biologiche dell' $\alpha$ -tomatina, ancora molto ridotte sono invece le informazioni ascrivibili al suo pathway metabolico.

L'obiettivo del presente lavoro di dottorato è stato, quindi, indagare il processo anabolico e catabolico dell' $\alpha$ -tomatina mediante l'isolamento e lo studio di alcuni geni in essi coinvolti.

Per quanto concerne lo studio dell'anabolismo, data la natura steroidea del glicoalcaloide, la nostra attenzione si è incentrata sulla biogenesi dei fitosteroli, il cui intermedio chiave è rappresentato dal 2,3-epossisqualene. Gli obiettivi che si intendevano perseguire in questa parte del lavoro di ricerca sono stati i seguenti:

- il clonaggio, mediante PCR di omologia, di cinque geni (*CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO*) coinvolti nelle prime fasi della biosintesi degli steroli vegetali;
- la definizione della struttura introne-esone del gene *SMT1*;
- l'analisi dei profili di espressione dei geni *CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* in diversi organi e specie selvatiche di pomodoro.

Per quanto riguarda lo studio del catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, l'attività di ricerca si è incentrata su:

- l'identificazione e lo studio di espressione di un gene putativamente coinvolto nel pathway di degradazione;
- l'applicazione di approcci di genomica funzionale per dimostrare il coinvolgimento del putativo gene nella via degradativa del glicoalcaloide.

In definitiva, il presente lavoro di dottorato si è proposto di delucidare il pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro, aprendo la strada a future applicazioni biotecnologiche orientate alla sua regolazione al fine di modulare i livelli di sintesi ed accumulo del glicoalcaloide in pianta.

Occorre sottolineare che la realizzazione di questo progetto è stata resa possibile grazie alla sinergia di competenze diverse che ne hanno inquadrato gli aspetti chimici, genetici e molecolari e che nel corso della sua realizzazione, il lavoro di questa tesi ha avuto il supporto dei seguenti finanziamenti:

- progetto RSTL “Studio del pathway biosintetico delle saponine steroidali in pomodoro e valutazione della loro attività biologica ed anti-colesterolemica” per la tematica: “Isolamento e studio di geni coinvolti nel pathway biosintetico dell' $\alpha$ -tomatina” del CNR-IGV, Portici;
- progetto MIUR: “Laboratorio di genomica per l'innovazione e la valorizzazione della filiera del pomodoro” GenoPOM del DISSPAPA e CNR-IGV, Portici;
- progetto MIUR: “Laboratorio nazionale di genomica e postgenomica degli organismi di interesse agrario” FIRB del CNR-IGV, Portici.

## RIASSUNTO

L' $\alpha$ -tomatina, uno dei più importanti metaboliti secondari del pomodoro, è un glicoalcaloide steroideo costituito da un aglicone, la tomatidina, di natura idrofobica e steroidea, a 27 atomi di carbonio e caratterizzata dalla presenza di un atomo di azoto che ne conferisce proprietà basiche; all'aglicone si lega una catena laterale idrofilica e tetrasaccaridica che prende il nome di licotetraosio. L' $\alpha$ -tomatina presenta importanti e numerose attività biologiche, basate essenzialmente sull'interazione con le membrane cellulari; in pianta, essa agisce come metabolita di difesa verso un ampio spettro di agenti fitopatogeni, ma presenta anche molte proprietà farmacologico-salutistiche come, ad esempio, quella anticolesterolemica, antinfiammatoria e antitumorale. In virtù di queste sue attività biologiche, l' $\alpha$ -tomatina può rientrare nel novero di quei metaboliti secondari di pianta da poter utilizzare sia in campo farmacologico sia agrochimico, soprattutto se si considera che, nonostante si tratti di un glicoalcaloide, la sua tossicità è molto bassa rispetto a quella di analoghi strutturali come la solanina. Tuttavia, come tutti i metaboliti secondari, anche l' $\alpha$ -tomatina presenta bassi livelli di concentrazione in pianta, quantità, tra l'altro, molto variabili nei diversi tessuti e nei diversi stadi fisiologici. Poiché il fattore limitante per l'uso delle biomolecole su larga scala è rappresentato proprio dalla loro ridotta produzione *in planta*, negli ultimi anni hanno trovato affermazione approcci biotecnologici finalizzati alla possibilità di incrementarne il contenuto nelle matrici organiche di partenza. Ognuna di queste strategie presuppone la conoscenza del pathway metabolico su cui si intende intervenire, e quindi degli enzimi chiave in esso coinvolti e dei geni per essi codificanti. A dispetto delle numerose conoscenze relative alle attività biologiche dell' $\alpha$ -tomatina, ancora molto ridotte sono invece le informazioni ascrivibili al suo pathway metabolico.

L'obiettivo del presente lavoro di dottorato è stato, quindi, indagare il processo anabolico e catabolico dell' $\alpha$ -tomatina mediante l'isolamento e lo studio di alcuni geni in essi coinvolti.

Per quanto concerne lo studio dell'anabolismo, data la natura steroidea del glicoalcaloide, la nostra attenzione si è incentrata sulla biogenesi dei fitosteroli, il cui intermedio chiave è rappresentato dal 2,3-epossisqualene. Nell'ambito di questa parte del lavoro, si è quindi proceduto al clonaggio, mediante tecniche PCR basate sull'omologia, di cinque geni (*CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO*) coinvolti nelle prime fasi della biosintesi degli steroli vegetali.

Per il gene *CAS1*, codificante per una cicloartenolo sintasi, è stato ottenuto, oltre al "full-length" della sequenza, un secondo prodotto di amplificazione, *CAS1- $\beta$* , con un più alto peso molecolare; dall'allineamento delle due sequenze si è evidenziato che *CAS1- $\beta$*  rispetto a *CAS1* riteneva un introne di 106 bp, determinando, a livello amminoacidico, la formazione di un codone

di "stop" prematuro. Analisi *in silico* hanno evidenziato la presenza di un sito di splicing alternativo a carico del gene *CAS1* di pomodoro; l'analisi di espressione di entrambe le sue isoforme è stata condotta in diversi organi e specie di *S. lycopersicum*, oltre che in condizioni di stress luminoso, evidenziando pattern di espressione tessuto, specie e stress-specifici.

Nell'ambito del presente lavoro di dottorato inerente lo studio del pathway biosintetico dell' $\alpha$ -tomatina, è stata anche definita, grazie ad un approccio "walking primer", la struttura intron-esone del gene *SMT1*; il gene della sterolo metiltransferasi 1 di pomodoro presenta 13 esoni intervallati da 12 introni con una fase intronica prevalente di tipo "0".

Le sequenze amminoacidiche dedotte dei cinque geni, infine, sono state analizzate mediante l'ausilio di specifici software bioinformatici al fine di delucidarne le caratteristiche strutturali e topologiche e, per ciascuno di essi, è stata allestita, mediante RT-PCR semiquantitativa, l'analisi dei profili di espressione in diversi organi (foglia, frutto verde e frutto rosso) e specie selvatiche di pomodoro (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*), analisi che hanno evidenziato pattern di espressione organo e specie-specifici.

Per quanto riguarda lo studio del catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, l'attività di ricerca si è incentrata sull'identificazione e lo studio, mediante approcci di genomica funzionale, di un gene putativamente coinvolto nel pathway di degradazione del metabolita.

La maggior parte delle informazioni disponibili sul catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, infatti, sono ascrivibili ai meccanismi di detossificazione del glicoalcaloide messi in atto da alcuni funghi patogeni del pomodoro quali *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *Septoria lycopersici*. Nel presente lavoro di tesi, quindi, al fine di individuare un enzima del pomodoro coinvolto nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, è stata condotta l'analisi BLAST della sequenza amminoacidica dedotta del gene *Xyl* (acc. number U24701) di *S. lycopersici* codificante per una tomatinasi, contro il genoma di *S. lycopersicum*. L'analisi *in silico* ci ha consentito di individuare due geni del pomodoro, *LeXYL1* e *LeXYL2*, entrambi codificanti per delle  $\beta$ -D-xilosidasi, enzimi coinvolti nei processi di "softening" che entrano in gioco nel corso della maturazione del frutto. Poiché *LeXYL1*, sulla base di quanto riportato in letteratura, mostra un comportamento inatteso rispetto alle altre xilosidasi, esprimendosi debolmente nelle fasi iniziali della maturazione del frutto e maggiormente nei suoi stadi più tardivi, abbiamo ipotizzato, data anche la sua omologia con la tomatinasi della *S. lycopersici*, un suo possibile coinvolgimento nel processo di degradazione dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro.

E' stata quindi condotta l'analisi trascrizionale del gene *LeXYL1*, mediante Real Time PCR in foglia, frutto verde e frutto rosso di *S. lycopersicum* cv. SM e della variante andina *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LA2213) che mostra elevati contenuti di  $\alpha$ -tomatina anche nel frutto

rosso. L'analisi ha mostrato che nel genotipo andino il livello di espressione di *LeXYL1* risulta simile in frutto verde e frutto rosso, mentre nella cv. SM l'espressione del gene appare elevata in frutto rosso, dove il glicoalcaloide è presente in ridotte quantità, e debole in frutto verde dove, invece, i livelli di  $\alpha$ -tomatina sono più elevati. Questi risultati hanno avvalorato la nostra ipotesi del possibile coinvolgimento di *LeXYL1* nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina e ci hanno portato a condurre lo studio funzionale di questo gene mediante approcci di overespressione e silenziamento.

La prima strategia non ci ha consentito di ottenere rigeneranti vitali; invece, grazie all'approccio RNAi, sono stati ottenuti undici rigeneranti T<sub>0</sub>-*LeXYL1*, i cui semi sono stati raccolti per la costituzione della generazione T<sub>1</sub>. Sulle piante T<sub>1</sub>-*LeXYL1* sono state, quindi, condotte analisi molecolari, mediante RT-PCR semiquantitativa, che ci hanno consentito di individuare quattro piante (T<sub>1</sub>-8-1, T<sub>1</sub>-10-1, T<sub>1</sub>-10-3 e T<sub>1</sub>-10-4) che mostravano una sottoespressione del gene; su queste piante sono state effettuate analisi morfologiche, che non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al controllo per i parametri considerati. Inoltre, le piante selezionate per la sottoespressione di *LeXYL1*, sono state utilizzate per la messa a punto di analisi chimiche che hanno previsto l'allestimento di un metodo di estrazione, separazione e quantificazione dell' $\alpha$ -tomatina.

In tutte le piante T<sub>1</sub>-*LeXYL1* il contenuto in  $\alpha$ -tomatina è risultato incrementato in maniera statisticamente significativa rispetto al controllo, confermando la nostra ipotesi di un possibile coinvolgimento di *LeXYL1* nel catabolismo del glicoalcaloide in pianta.

In conclusione, il presente lavoro di ricerca, ha contribuito ad una maggiore comprensione dei meccanismi genici che presiedono alla sintesi e alla degradazione dell' $\alpha$ -tomatina *in planta*, aprendo la strada a futuri approcci biotecnologici finalizzati alla regolazione dei pathway biochimici di questo metabolita del pomodoro dotato di interessanti proprietà biologiche.



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Metaboliti secondari di pianta e loro impiego

Le piante rappresentano una fonte preziosa ed inesauribile di metaboliti secondari, sostanze naturali per le quali, alla fine del 1800, è stata introdotta tale definizione quasi a volerne sottolineare un ruolo non indispensabile per la vita degli organismi. Tuttavia, con lo sviluppo della biochimica nel XX secolo, e quindi con il miglioramento e l'introduzione di tecniche analitiche più avanzate, è stato possibile assegnare ai vari prodotti naturali il ruolo che essi giocano nei processi biochimici e fisiologici degli esseri viventi: così, ad esempio, gli acidi grassi sono stati identificati come componenti delle strutture lipidiche, gli amminoacidi come costituenti delle proteine e le purine e le pirimidine come unità di base degli acidi nucleici. A tali prodotti, ubiquitari in natura, venne data la definizione di “metaboliti primari” (Williams *et al.* 1989), mentre ad altri quali alcaloidi, terpeni, polieni, fenoli etc., per i quali era più difficile stabilirne un ruolo biochimico e fisiologico, venne assegnata la definizione di “metaboliti secondari”.

In realtà, la distinzione tra metaboliti primari e secondari non è così netta; infatti, bisogna considerare che il metabolismo primario dà luogo alla formazione di molecole che sono poi utilizzate come precursori del metabolismo secondario (Aharoni e Galili 2010). Inoltre, molti metaboliti definiti secondari, svolgono, in realtà, funzioni di estrema importanza per la regolazione dei meccanismi biochimici degli organismi viventi (Oksman-Caldentey e Inzè 2004); la lignina ad esempio, presente nelle pareti delle cellule vegetali, è uno dei più abbondanti biopolimeri presenti in natura ed è di importanza primaria per lo sviluppo delle strutture vascolari delle piante (Zhong e Ye 2009); gli steroidi svolgono una serie di funzioni fondamentali quali la regolazione della permeabilità e della fluidità delle membrane cellulari (Schaller 2003). Inoltre, per molti altri metaboliti secondari, è stato riconosciuto un ruolo a livello cellulare come regolatori della crescita, modulatori dell'espressione genica e trasduttori di segnale (Theis e Lerchau 2003).

In pianta, i prodotti del metabolismo secondario tendono essenzialmente a migliorare la fisiologia dell'organismo favorendone la protezione da agenti fitopatogeni e da stress abiotici, sopprimendo la crescita di specie infestanti, attraendo insetti impollinatori e agendo come segnali di interazione con le altre piante (Wink 1988). Nel corso dell'evoluzione, dunque, le specie vegetali hanno prodotto migliaia di metaboliti secondari dalle numerose attività biologiche che Kliebenstein (2004) raggruppa nelle classi principali dei glucosinolati ( $\approx 36\%$ ), dei fenilpropanoidi ( $\approx 20\%$ ), dei terpenoidi ( $\approx 20\%$ ) e delle fitoalessine ( $\approx 15\%$ ).

Poiché si stima che le piante producono oltre 200000 metaboliti (Fiehn 2002), negli ultimi anni un crescente interesse si è concentrato sulla ricerca di nuove sostanze di origine naturale da impiegare soprattutto in campo farmaceutico ed agrochimico per la produzione di farmaci e biopesticidi.

Il ricorso alle sostanze naturali per scopi farmacologici e salutistici risale a più di 60000 anni fa, quando i prodotti minerali, vegetali e animali rappresentavano per l'uomo l'unica fonte di medicinali. Con il passare del tempo si è assistito ad un impiego sempre maggiore di molecole naturali per scopi curativi; nel 1805, il farmacista tedesco Friedrich Wilhelm Sertürner isolò la morfina dal *Papaver somniferum*, alcaloide che diventò il primo farmaco di origine naturale ad essere prodotto e commercializzato dalla compagnia farmaceutica Merck nel 1826. Da allora la produzione di farmaci a base di sostanze naturali, soprattutto di origine vegetale, è andata incrementandosi, basti pensare alla commercializzazione di prodotti, ancora oggi in uso, quali la salicina, estratta dal *Salix alba*, l'emetina dalla *Cephaelis ipecacuanha*, il chinino ottenuto dalla *Cinchona ledgeriana* e l'atropina estratta dall'*Atropa belladonna*. Si stima che oltre il 60% dei farmaci antitumorali e il 66% degli antimicrobici (che includono antibatterici, antifungini, antivirali) presenti attualmente sul mercato siano prodotti naturali o da essi derivati (Newman e Cragg 2008). Non a caso, la versione più recente del "Dictionary of Natural Products" (<http://dnp.chemnetbase.com>) conta, ad oggi, l'annotazione di circa 214000 prodotti di origine naturale, la maggior parte dei quali trovano impiego nei settori della farmacologia e della salute umana, ambiti dove fitochimici come terpenoidi, fenoli, alcaloidi e fibre vengono utilizzati soprattutto come cofattori enzimatici, come composti in grado di aumentare l'assorbimento e/o la stabilità di nutrienti essenziali, come substrati di fermentazione per batteri benefici e inibitori selettivi di batteri dannosi (Dillard e German 2000).

Più di 100 prodotti di origine naturale sono utilizzati nell'ambito di trials clinici e si stima che almeno altri 100 composti siano in fase di sviluppo preclinico, con una notevole prevalenza di prodotti derivati da piante; alcuni esempi sono riportati in Tabella 1 (Harvey 2008).

**Tabella 1** - Fasi dello sviluppo clinico dei prodotti farmaceutici di origine naturale e fasi di impiego in trials clinici. Fonte: Pharmaprojects database (Marzo 2008).

Stadio di sviluppo clinico	Origine					Totale
	Piante	Batteri	Funghi	Animali	Semi-sintetici	
Preclinico	46	12	7	7	27	<b>99</b>
I	14	5	0	3	8	<b>30</b>
II	41	4	0	10	11	<b>66</b>
III	5	4	0	4	13	<b>26</b>
Pre-registrazione	2	0	0	0	2	<b>4</b>
<b>Totale</b>	<b>108</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>61</b>	<b>225</b>

Agli inizi degli anni 90, numerose industrie farmaceutiche avevano destinato una larga parte dei loro fondi allo studio e alla ricerca di nuovi farmaci di origine vegetale, avvalendosi soprattutto delle tecniche di chimica combinatoriale per identificare e generare nuove molecole ad azione farmacologica da impiegare prevalentemente nel trattamento del cancro e delle malattie infettive (Ma e Wang 2009).

Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, tali industrie hanno notevolmente diminuito il rilascio sul mercato di farmaci di origine naturale, in quanto gli studi e le ricerche alla base della loro produzione su scala industriale risultano particolarmente difficoltosi ed onerosi. Tra i diversi motivi che hanno portato a preferire i prodotti di sintesi nei trattamenti farmacologici rientra, senza dubbio, la difficoltà non solo di produrre, ma anche di modificare strutturalmente le molecole di origine naturale al fine di renderle più attive (Giezen *et al.* 2009). Inoltre, spesso le quantità del principio attivo che si ritrova nelle matrici organiche, e principalmente in quelle vegetali, sono estremamente ridotte, richiedendo grandi quantità del materiale di partenza che non sempre è facilmente reperibile. Alla luce di quanto detto, trova giustificazione il fatto che delle oltre 400000 specie di piante, solo una piccola percentuale è stata finora studiata per la produzione di metaboliti secondari ad azione farmacologico-salutistica. Non è un caso che, nel 2005, l'unico prodotto di origine naturale approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) fu il Nexavar<sup>TM</sup>, inibitore multichinasico anti-tumorale rilasciato e commercializzato dalla Bayer (Newman e Cragg 2008). Inoltre, nel 2007, vennero registrati solo 17 nuovi farmaci di origine naturale, rispetto ai 53 che furono invece approvati dalla FDA nel 1996 (Ji *et al.* 2009). In generale, si stima che nel periodo che va dal 2001 al 2008, ci sia stato un abbattimento di circa il 30% nello sviluppo di prodotti e/o

trattamenti a base di sostanze naturali (Harvey 2008) e che, attualmente, i biofarmaci disponibili sul mercato non siano più di 200 (Walsh 2010).

Tuttavia bisogna sottolineare che, nonostante le difficoltà legate allo studio e all'isolamento dei fitochimici, essi hanno il vantaggio di mostrare, per alcune patologie, una maggiore efficacia rispetto ai medicinali di sintesi oltre ad avere una minore incidenza di effetti collaterali. Inoltre, bisogna tener conto del fatto che una larga percentuale della popolazione mondiale non può avere accesso ai trattamenti farmacologici convenzionali. Queste considerazioni rappresentano la base concettuale su cui si inserisce la ricerca scientifica che, associando alle tecniche tradizionali di miglioramento genetico i più recenti ed innovativi approcci biotecnologici, può mirare ad incrementare il contenuto di metaboliti secondari in pianta oltre che migliorarne e semplificarne i protocolli di estrazione e purificazione.

Tenendo conto, dunque, dei notevoli progressi che si sono avuti in questi ultimi anni nel campo della biochimica e della biologia molecolare che hanno aperto la strada alla comprensione dei meccanismi enzimatici che controllano il metabolismo dei prodotti naturali, risulta possibile inserire l'impiego dei metaboliti secondari estratti da pianta anche nel settore agrochimico, venendo incontro ad un'esigenza sempre più attuale di disporre di sistemi di difesa delle colture agrarie a minor impatto sia sull'ambiente sia nei confronti degli operatori del settore e dei consumatori (Dixon 2001).

I biopesticidi offrono diversi vantaggi rispetto ai fitofarmaci tradizionali; sono generalmente più sicuri di quelli chimici che spesso hanno effetti nocivi sulla salute umana e sull'ambiente e mostrano un'attività biologica più selettiva nei confronti di un determinato agente patogeno (al contrario dei prodotti di sintesi che spesso agiscono su organismi non bersaglio). Inoltre, i fitofarmaci a base naturale agiscono generalmente in piccole quantità, risultano più facilmente degradabili rispetto ai prodotti chimici ed il loro impiego trova ampio spazio nei programmi di lotta biologica ed integrata, offrendo maggiore protezione alle specie agrarie e riducendo drasticamente l'uso dei pesticidi convenzionali (Rattan 2010).

Per quel che concerne i formulati a base di estratti vegetali, alcuni esempi si ritrovano nei prodotti a base di azadiractina, terpene ciclico estratto dai semi dell'*Azadiractha indica*, meglio nota come albero di Neem. Numerosi sono anche i biopesticidi a base di nicotina, alcaloide estratto dalla *Nicotiana tabacum* in grado di interagire con il recettore dell'acetilcolina causando danni al sistema nervoso degli insetti (Ohno *et al.* 2009). Tra i composti di origine vegetale ad azione insetticida rientrano anche le piretrine estratte dal *Tanacetum cinerariifolium* (*Asteraceae*), una miscela di esteri dell'acido crisantemico e dell'acido piretrico con tre cheto-alcoli (piretrolone, jasmolone e

cinerolone), molecole in grado di legare i canali del sodio degli insetti causandone la morte (Abdi *et al.* 2011).

Tuttavia il mercato dei fitofarmaci a base naturale occupa, tutt'ora, solo una piccola percentuale dell'intera gamma di prodotti, per lo più di sintesi, utilizzati per la difesa delle specie agrarie. Tra i motivi che giustificano ciò vi sono sicuramente alcuni limiti che gli agrofarmaci derivati da fonti naturali ancora presentano rispetto a quelli convenzionali: azione lenta, poca stabilità e scarsa persistenza; inoltre, non va sottovalutata l'incidenza che ha, in questo contesto, il grande potere economico delle industrie del settore.

Nonostante ciò, nel corso dei prossimi anni si prevede un aumento del tasso di espansione del commercio dei biopesticidi; infatti già dal 2000 al 2005 la loro percentuale sul mercato rispetto ai fitofarmaci totali è aumentata dallo 0,2% al 2,5% (Thakore 2006). Attualmente sono registrati e commercializzati più di 1000 formulati basati su più di 200 metaboliti attivi di origine naturale (Gopinathan e Sudhakaran 2008).

L'esigenza di una maggiore utilizzazione di prodotti naturali in campo agronomico risulta fondamentale soprattutto per i Paesi in via di sviluppo dove la maggior parte delle malattie e delle infezioni a danno delle popolazioni è causata proprio dagli effetti nocivi degli agrofarmaci convenzionali (Isman 2008). Nelle regioni dell'Ecuador adibite alla coltivazione della patata, ad esempio, l'impatto dei pesticidi di sintesi sulla salute umana è tale da costituire la prima causa di mortalità (Yanggen *et al.* 2004).

Nelle piante sono presenti numerosi principi attivi biocidi essendo, questi, il risultato di processi evolutivi finalizzati all'autoprotezione della pianta da patogeni, erbivori e competitori (Bourgaud *et al.* 2001). A tutt'oggi sono state identificate più di 860 specie vegetali produttrici di sostanze con proprietà insetticide, oltre a circa 150 specie di piante in grado di produrre metaboliti secondari attivi contro nematodi, roditori e molluschi (Adeyemi 2010). Terpenoidi, alcaloidi, saponine ed oli essenziali vanno a rappresentare le principali classi di metaboliti secondari di origine vegetale note per le loro proprietà insetticide/pesticide (Salunke *et al.* 2009).

I terpenoidi sono caratterizzati da una grande varietà strutturale e vengono sintetizzati mediante la combinazione di un numero progressivo di unità isopreniche a cinque atomi di carbonio sotto forma degli equivalenti biologici di isopentenilpirofosfato e dimetilallilpirofosfato che possono poi ciclizzare, riarrangiare o essere funzionalizzati in vario modo per formare monoterpeni (C10), sesquiterpeni (C15), diterpeni (C20), triterpeni (C30) e tetraterpeni (C40) (Langenheim 1994). Uno degli esempi più significativi circa le attività antimicrobiche dei terpenoidi è sicuramente ascrivibile all'olio di Neem, già precedentemente menzionato ed utilizzato prevalentemente come insetticida naturale e come agente antifungino contro *Drechslera oryzae*,

*Fusarium oxysporum* e *Alternaria tenuis* (Prakash *et al.* 2002). Alcuni terpenoidi estratti da *Citrus* spp., come il limonene, vengono impiegati nel controllo degli insetti fitopatogeni grazie alla loro capacità di agire come fagodeterrenti (Adeyemi 2010).

Gli alcaloidi sono molecole caratterizzate dalla presenza di un atomo di azoto basico che è determinante per le loro attività biologiche basate, principalmente, su meccanismi di interazione con le membrane cellulari (Friedman 2002). La nicotina estratta dal tabacco (*Nicotiana tabacum*) viene utilizzata, ad esempio, in specifiche formulazioni come insetticida naturale (Casanova *et al.* 2002); la caffeina, presente nelle piante del caffè (*Coffea arabica*), del tè (*Camelia sinensis*) e del cacao (*Theobroma cacao*) manifesta una forte azione insetticida nei confronti della *Drosophila melanogaster* e di *Hypothenemus hampei* soprattutto se utilizzata in formulazioni con aggiunta di acido oleico (Araque *et al.* 2007); la pipernolanina, un alcaloide estratto dal *Piper longum*, esplica la propria attività fungicida contro *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Erysiphe graminis* (Lee *et al.* 2001).

Le saponine (o saponosidi) sono glicosidi di origine vegetale che prendono il nome dalla *Saponaria officinalis*, la pianta in cui furono riscontrati per la prima volta. Strutturalmente, sono formate dall'unione di residui zuccherini (come glucosio, fruttosio, galattosio, arabinosio od altri) con una molecola non zuccherina (aglicone o sapogenina) (Price *et al.* 1987). Questa struttura particolare è alla base dell'attività detergente delle saponine in quanto gli zuccheri rappresentano la parte idrosolubile mentre l'aglicone risulta essere quella liposolubile. La loro attività biologica è principalmente legata ai meccanismi di interazione con le membrane cellulari (Osbourn 2003); le piante risultano protette dalle loro stesse saponine poiché le tengono compartimentalizzate nei vacuoli, le cui membrane hanno un basso o alterato contenuto di steroli. I residui zuccherini sono presenti in numero variabile da una a sei unità, mentre le sapogenine hanno una struttura più complessa, riconducibile a due gruppi: triterpenico e steroideo. Le saponine a nucleo triterpenico (come la glicirrizina della liquirizia o l'escina dell'ippocastano) hanno una struttura pentaciclica a 30 atomi di carbonio mentre quelle a nucleo steroideo ne hanno una di base con 27 carboni (spesso la catena alifatica è trasformata in due anelli eterociclici). Alcune saponine dell'erba medica, come l'acido zanico tridesmoside, manifestano una significativa azione entomocida contro l'afide *Acyrtosiphon pisum* (Goławska 2007). Le saponine triterpenoidiche appartenenti al genere *Medicago* (*M. sativa*, *M. arborea* e *M. arabica*) mostrano proprietà antimicrobiche nei confronti di lieviti come *Saccharomyces cerevisiae*, di batteri Gram-negativi ma soprattutto verso batteri Gram-positivi quali *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* ed *Enterococcus faecalis* (Avato *et al.* 2006). Molte saponine di specie appartenenti alle famiglie delle *Annoaceae*, delle *Solanaceae* e

delle *Meliaceae* agiscono come potentissimi insetticidi naturali in un'azione sinergica con gli altri metaboliti secondari che caratterizzano tali specie (Castillo *et al.* 2010).

Gli oli essenziali sono costituiti da composti volatili ottenuti da specie particolarmente ricche in metaboliti biologicamente attivi. Oli essenziali estratti da *Ocimum sanctum*, *Prunus persica* e *Zingiber officinale* mostrano proprietà fungicide contro *Alternaria citri*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium roseum*, *Geotrichum candidum*, *Monilinia fructicola* e *Mucor pyriformis*, risultando ottimi candidati per la produzione di biopesticidi per il controllo dei patogeni soprattutto nelle fasi post-raccolta e di conservazione di frutta e verdura (Tripathi *et al.* 2008). Altri studi hanno provato che oli essenziali estratti da *Achillea gypsicola* e *A. biebersteinii* (*Asteraceae*) hanno attività erbicida contro infestanti quali *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Cirsium arvense* L., *Lactuca serriola* L. e *Rumex crispus* L. (Kordali *et al.* 2009).

Le principali proprietà biopesticide di alcuni metaboliti secondari di origine vegetale sono riassunte in Tabella 2.

**Tabella 2** - Principali attività biopesticide di alcuni metaboliti secondari di origine vegetale.

Molecola	Specie	Attività	Principali organismi bersaglio
Azadiractina	<i>Azadirachta indica</i>	Insetticida	Oltre 200 specie tra cui Ortotteri, Afidi e Lepidotteri
		Antifungina	<i>Drechslera oryzae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria tenuis</i> .
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	Insetticida	Afidi
Caffeina	<i>Coffea arabica</i> , <i>Camelia sinensis</i> , <i>Theobroma cacao</i>	Insetticida	<i>Manduca sexta</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Hypothenemus hampei</i> .
Pipernolanina	<i>Piper longum</i>	Antimicrobica	<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cineria</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Puccinia recondita</i> , <i>Erysiphe graminis</i> .
Acido zanico tridesmoside	<i>Medicago spp.</i>	Insetticida	<i>Acyrtosiphon pisum</i> .
		Antimicrobica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> .
$\alpha$ -solanina, $\alpha$ -chaconina	<i>Solanum tuberosum</i>	Insetticida	<i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> .
		Antifungina	<i>Ascobolus crenulatus</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Phoma medicaginis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> .
1,8 cineolo, piperitone, $\alpha$ -terpineolo	<i>Achillea gypsicola</i> , <i>A. biebersteinii</i>	Erbicida	<i>Amaranthus retroflexus</i> L., <i>Chenopodium album</i> L., <i>Cirsium arvense</i> L., <i>Lactuca serriola</i> L., <i>Rumex crispus</i> L.

Va menzionato, infine, che la vasta gamma di metaboliti secondari di origine vegetale comprende alcune molecole che manifestano sia attività biologiche di tipo salutistico-farmacologico sia di tipo agrochimico. Molti prodotti derivati dal pathway dei fenilpropanoidi, ad esempio, giocano un ruolo essenziale nei meccanismi di difesa delle piante, risultando molecole idonee per la



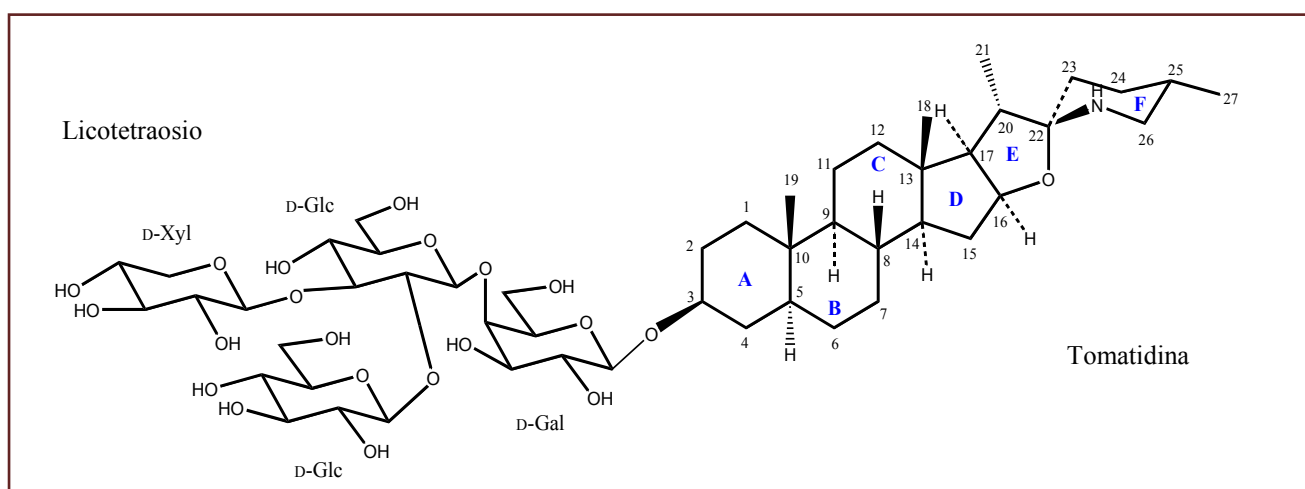
formulazione di fitofarmaci naturali, ma anche molecole attive per la produzione di farmaci per il trattamento di diverse patologie umane (Ververidis *et al.* 2007).

A far parte di suddetta categoria rientra anche l' $\alpha$ -tomatina, principale glicoalcaloide del pomodoro (*Solanum lycopersicum*).

## 1.2 $\alpha$ -tomatina: caratteristiche strutturali e biochimiche

L' $\alpha$ -tomatina è un glicoalcaloide steroideo che si ritrova in diverse specie di pomodoro; viene sintetizzata in organelli citoplasmatici e si accumula nei vacuoli e/o nella frazione solubile del citoplasma (Roddick 1976).

L' $\alpha$ -tomatina fu isolata per la prima volta dalla specie selvatica di pomodoro *Solanum pimpinellifolium* e venne descritta come un glicoalcaloide composto da un aglicone, detto tomatidina, e da un tetrasaccaride, chiamato licotetraosio e formato da un residuo di galattosio, due di glucosio e uno di xilosio (Figura 1) (Fontaine *et al.* 1948).



**Figura 1** - Struttura chimica dell' $\alpha$ -tomatina. Legenda: D-Gal, D-galattosio; D-Glc, D-glucosio; D-Xyl, D-xilosio.

La natura dell'aglicone venne caratterizzata mediante l'utilizzo di metodi spettroscopici (essenzialmente NMR) applicati ad alcuni suoi derivati quali l'*N,O*-diacetiltomatidina, il colesterolo e l'acetilcolesterolo (Fontaine *et al.* 1951). Kuhn e collaboratori (1956) isolarono un composto analogo alla tomatidina, caratterizzato dalla presenza di un doppio legame nell'anello B del nucleo steroideo. In realtà, se pur inconsapevolmente, erano state descritte le proprietà strutturali della

deidrotomatina e del suo aglicone, il tomatidenolo che, infatti, si differenzia dalla tomatidina unicamente per l'insaturazione in posizione C-5 e C-6 (Friedman e Levin 1998). Entrambi i glicosidi si ritrovano in tutte le parti vegetative e nei frutti della pianta del pomodoro (Kozukue *et al.* 2004).

La struttura del licotetraosio è stata definita mediante lo studio dei suoi prodotti di idrolisi acida:  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2-tomatina (aglicone legato a tre unità saccaridiche),  $\gamma$  e  $\delta$ -tomatina (aglicone legato, rispettivamente, a due e ad una unità saccaridica) (Willker e Leibfritz 1992).

Molte proprietà biologiche dell' $\alpha$ -tomatina sono da ascrivere alla presenza del gruppo amminico nell'anello F 3-metilpiperidinico che forma un legame spiranico con il C-22 dell'unità steroidea (Martin-Smith e Sugrue 1964). La presenza dell'atomo di azoto nella struttura dell'aglicone classifica l' $\alpha$ -tomatina come un'ammina secondaria (Fontaine *et al.* 1951) annoverandola nel gruppo degli alcaloidi, e più nello specifico, dei glicoalcaloidi, in virtù della presenza della catena tetrasaccaridica legata al nucleo steroideo. I glicoalcaloidi sono gli analoghi azotati delle saponine dalle quali si differenziano, oltre che per la presenza del gruppo amminico, anche per la stereochimica al C-25: questa, infatti, può variare nelle saponine, generando miscele di diastereoisomeri, ma resta invariata negli alcaloidi (metile sempre in posizione equatoriale) generando, invece, stereoisomeri in C-22 (Robinson 1974).

In pomodoro, i livelli di  $\alpha$ -tomatina sono legati principalmente allo stadio fenologico dei diversi organi della pianta (Leonardi *et al.* 2000). Ad esempio, nel frutto, i livelli del glicoalcaloide si riducono drasticamente nel corso della maturazione; è stato dimostrato, infatti, che i pomodori verdi immaturi contengono più di 500 mg di  $\alpha$ -tomatina per kg di frutto fresco; il composto è, però, in gran parte degradato nel pomodoro durante la maturazione ed a maturità esso raggiunge livelli di  $\approx 5$  mg per kg di frutto fresco. I prodotti della degradazione della tomatina sono probabilmente incanalati nei pathway biosintetici dei carotenoidi e della clorofilla, come suggerito da Eltayeb e Roddick (1984).

Attraverso analisi HPLC effettuate su varietà giapponesi di pomodoro quali Momotaro, Momotaro-T93 e First Memory, è stato possibile verificare che già dopo 20 giorni dalla fioritura i livelli di concentrazione della deidrotomatina e dell' $\alpha$ -tomatina si riducono, rispettivamente, del 96% e del 94% e che, dopo 50 giorni dalla fioritura, si ha la totale scomparsa del glicoalcaloide (Kozukue *et al.* 2004). I livelli di deidrotomatina e  $\alpha$ -tomatina, inoltre, variano in tutti i tessuti della pianta anche se con valori differenti da quelli che si riscontrano nelle bacche, probabilmente perché il loro metabolismo nei frutti è regolato in maniera differente ed indipendente da quello delle parti vegetative (Kozukue e Friedman 2003).

Oltre che dallo stato di maturazione, i livelli di  $\alpha$ -tomatina in pomodoro sono anche determinati dal genotipo. Ad esempio, la varietà *cerasiforme* di *S. lycopersicum*, un biotipo che si ritrova quasi esclusivamente nella valle del Rio Mayo in Perù, si caratterizza per il suo elevato contenuto in  $\alpha$ -tomatina nel frutto (500-5000  $\mu\text{g/g}$  di peso secco) che rimane tale anche nelle fasi più avanzate della maturazione (Rick *et al.* 1994). Di recente, mediante un approccio di genomica funzionale comparativa, è stato caratterizzato il profilo metabolico dei tricomi ghiandolari di quattro specie selvatiche di pomodoro (*S. habrochaites*, *S. pennellii*, *S. arcanum* e *S. pimpinellifolium*) e della specie coltivata *S. lycopersicum*; i dati hanno evidenziato profili metabolici estremamente differenti tra le diverse specie analizzate; tra queste, *S. habrochaites* è risultata caratterizzata da un elevato contenuto di  $\alpha$ -tomatina e deidrotomatina (McDowell *et al.* 2011).

### 1.3 Meccanismi d'azione ed attività biologiche dell' $\alpha$ -tomatina

Come tutti i glicoalcaloidi, anche l' $\alpha$ -tomatina presenta un ampio spettro di attività biologiche che vanno dall'azione allelopatica a quella antimicrobica e di difesa delle piante, in virtù della sua capacità di formare complessi con gli steroli aumentando la permeabilità delle membrane biologiche (Morrissey 2009). Questo meccanismo è alla base delle proprietà antifungine dell' $\alpha$ -tomatina; infatti, specie fungine quali *Pythium* e *Phytophthora*, che non presentano steroli nelle loro membrane, risultano insensibili all'azione del glicoside (Ruiz-Rubio *et al.* 2001).

Il principale meccanismo di difesa dei funghi fitopatogeni dall' $\alpha$ -tomatina sembra essere basato sulla rimozione di uno o più carboidrati dal licotetraosio; ad esempio, la *Septoria lycopersici* produce una tomatinasi extracellulare che idrolizza il legame  $\beta$ -1,2-glucosidico della frazione saccaridica per formare la  $\beta$ <sub>2</sub>-tomatina (Sandrock *et al.* 1995). Il patogeno *Botrytis cinerea* rimuove la molecola terminale di xilosio per dare origine alla  $\beta$ <sub>1</sub>-tomatina (Quidde *et al.* 1998), mentre il fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produce una tomatinasi extracellulare inducibile che detossifica l' $\alpha$ -tomatina idrolizzandola nella frazione glucosidica (licotetraosio) e nell'aglicone (tomatidina) (Lairini *et al.* 1996). In particolare, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mette in atto un meccanismo di morte cellulare programmata indotto dall' $\alpha$ -tomatina che attiva una fosfotirosina chinasi che, a sua volta, dà inizio ad una cascata di trasduzione del segnale che culmina con l'incremento dei livelli di calcio ed accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule del patogeno (Ito *et al.* 2007).

L' $\alpha$ -tomatina sembra essere coinvolta anche nei meccanismi di difesa della pianta nei confronti di insetti e batteri fitopatogeni. Recentemente è stato osservato come le bacche del

pomodoro rappresentino un nuovo sito di colonizzazione per il lepidottero della patata *Phthorimaea operculella*, ma la sopravvivenza, la crescita e lo sviluppo delle larve appaiono essere inversamente correlate al grado di maturazione ed al contenuto in  $\alpha$ -tomatina dei frutti (Mulatu *et al.* 2006). Anche il tasso di crescita del batterio *Pseudomonas solanacearum* risulta inversamente proporzionale ai livelli di  $\alpha$ -tomatina nel fusto e nelle radici della pianta del pomodoro (El-Raheem *et al.* 1995). Interessante è anche l'attività dell' $\alpha$ -tomatina nell'inibizione del virus del mosaico del tabacco (TMV) (González-Lamothe *et al.* 2009).

L' $\alpha$ -tomatina assume un ruolo significativo anche nella dieta umana; è nota da tempo, infatti, la sua attività anticolesterolemica che riduce il contenuto del colesterolo LDL senza modificare il contenuto del colesterolo HDL; infatti queste molecole sono capaci di formare un complesso alcaloide-colesterolo nel tratto intestinale con conseguente mancato assorbimento di quest'ultimo; il legame del colesterolo avviene a livello della catena laterale saccaridica dell' $\alpha$ -tomatina (Stine *et al.* 2006).

Tra gli altri effetti che il glicoalcaloide esplica a vantaggio della salute umana, va menzionata la sua capacità di inibire la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali di colon (HT-29), fegato (HepG2), seno (MCF-7) e tratto gastrointestinale (AGS) (Friedman *et al.* 2009). L' $\alpha$ -tomatina, inoltre, inattiva i segnali FAK/PI3K/Akt e sopprime il legame al DNA del fattore di regolazione NF- $\kappa$ B, bloccando la migrazione delle cellule NCI-H460 ("non-small cell lung cancer cells") responsabili dell'insorgenza del tumore polmonare (Shieh *et al.* 2011). Inoltre l' $\alpha$ -tomatina è in grado di bloccare le cellule tumorali della prostata (PC-3) inducendo un meccanismo di apoptosi e inibendo il segnale NF- $\kappa$ B (Lee *et al.* 2011).

Chiu e Lin (2008) hanno evidenziato le proprietà antinfiammatorie della tomatidina; infatti, tale composto, presenta una struttura simile a quella dei glucocorticoidi, ormoni steroidei capaci di contrastare le risposte infiammatorie, ed è in grado, pertanto, di inibire la ciclossigenasi 2 (COX-2), uno degli enzimi responsabili della sintesi delle prostaglandine. Particolarmente interessante è anche il ruolo che l' $\alpha$ -tomatina svolge come adiuvante del vaccino della malaria, grazie ad un meccanismo correlato all'azione delle cellule CD8<sup>+</sup> T e al rilascio dell'interferone  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Heal e Taylor-Robinson 2010).

L' $\alpha$ -tomatina, inoltre, presenta significative proprietà antibiotiche verso agenti microbici quali *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (Lukasik *et al.* 2001) e *Listeria monocitogenes* (Pingulkar *et al.* 2001).

E' importante sottolineare che sebbene l' $\alpha$ -tomatina alteri le membrane cellulari, diversi studi ne hanno dimostrato una bassa tossicità orale, soprattutto se comparata con quella di altre molecole analoghe come la solanina (Friedman *et al.* 2003); infatti, Friedman e collaboratori (1996)

hanno riportato che l' $\alpha$ -tomatina addizionata ad alcuni alimenti somministrati a criceti non comporta alcun aumento del loro peso sia a livello corporeo sia a livello epatico, contrariamente a quanto si verifica con la solanina.

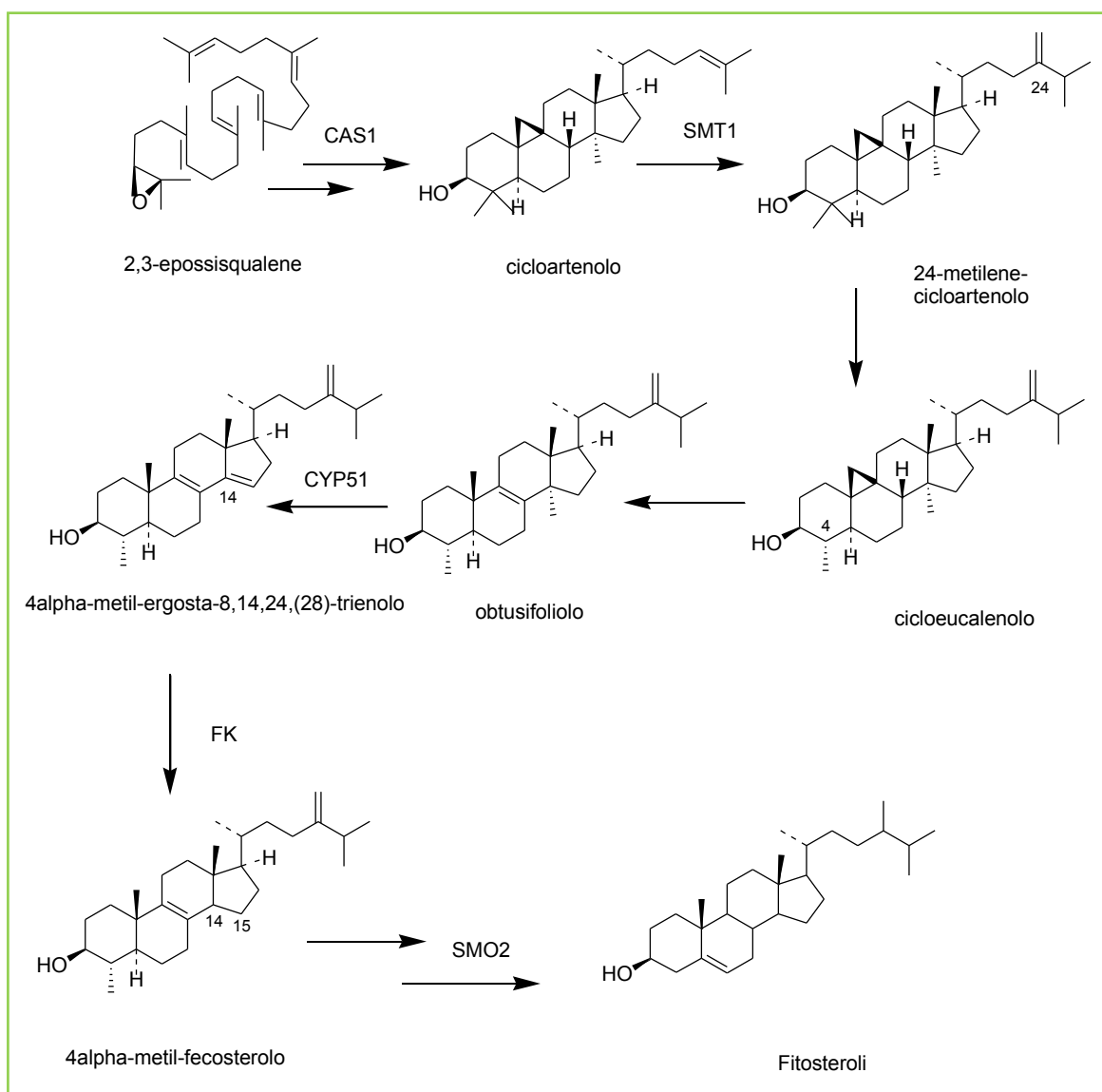
#### 1.4 Pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina

I meccanismi biochimici e molecolari che portano alla sintesi dell' $\alpha$ -tomatina risultano particolarmente complessi ed articolati, tanto che, ad oggi, la maggior parte di essi non è stata ancora completamente delucidata. Tuttavia, data la natura steroidea del glicoalcaloide, si ipotizza che il suo pathway biogenetico sia associato a quello del colesterolo, il cui intermedio chiave è il 2,3-epossisqualene (Friedman *et al.* 1998). Dalla sua ciclizzazione, infatti, originano i due principali metaboliti che rappresentano il punto di diramazione della biosintesi, rispettivamente, degli steroli animali e vegetali: il lanosterolo ed il cicloartenolo (Friedman 2002).

Nello specifico, la ciclizzazione del 2,3-epossisqualene avviene attraverso l'intermedio squalene-2,3-ossido, che, posizionandosi opportunamente nel sito catalitico dell'enzima, genera la struttura terpenica triciclica attraverso la formazione di carbocationi e la migrazione di gruppi metilici e idruro (Abe *et al.* 1993). Una volta formatosi il catione terziario protosterile, questo va incontro a vari riarrangiamenti, eliminazioni e/o migrazioni di idruri, generando il lanosterolo nelle cellule animali e nei funghi, ed il cicloartenolo in pianta (Rees *et al.* 1968). La formazione di quest'ultimo intermedio è catalizzata dall'enzima cicloartenolo sintasi (CAS1). Successivamente, per azione dell'enzima *S*-adenosilmetionina-(AdoMet)-sterol-C-metiltransferasi (SMT) e attraverso un meccanismo di addizione elettrofila, viene aggiunta un'unità di carbonio in posizione C-24 alla (*S*)-adenosil-L-metionina (SAM) (Nes *et al.* 1991); l'intermedio carbocationico, per successiva eliminazione di un protone, genera il doppio legame in C-24 e C-28 del 24-metilene-cicloartenolo. La rimozione di uno dei due gruppi metilici in C-4 del 24-metilene-cicloartenolo determina la formazione del cicloeucalenolo attraverso una reazione che prevede l'intervento di tre diversi enzimi, una sterolo metilossidasi (SMO1), una  $3\beta$ -idrossisteroid-deidrogenasi/C4-decarbossilasi ( $3\beta$ HSD/D) e una 3-chetosteroid-reduttasi (SR) (Pascal *et al.* 1994). In pianta, questo meccanismo di demetilazione avviene in due fasi distinte della sintesi dei fitosteroli, contrariamente a quanto non accada, invece, nel pathway biogenetico degli steroli di funghi e mammiferi dove i due gruppi metilici vengono rimossi in successione (Rahier 2010). A partire dal cicloeucalenolo si ha, poi, la sintesi dell'obtusifoliolo, grazie all'intervento dell'enzima cicloeucalenolo cicloisomerasi (CYC1) che catalizza l'apertura dell'anello ciclopropanico (Rahier *et al.* 1989); questa reazione sembra

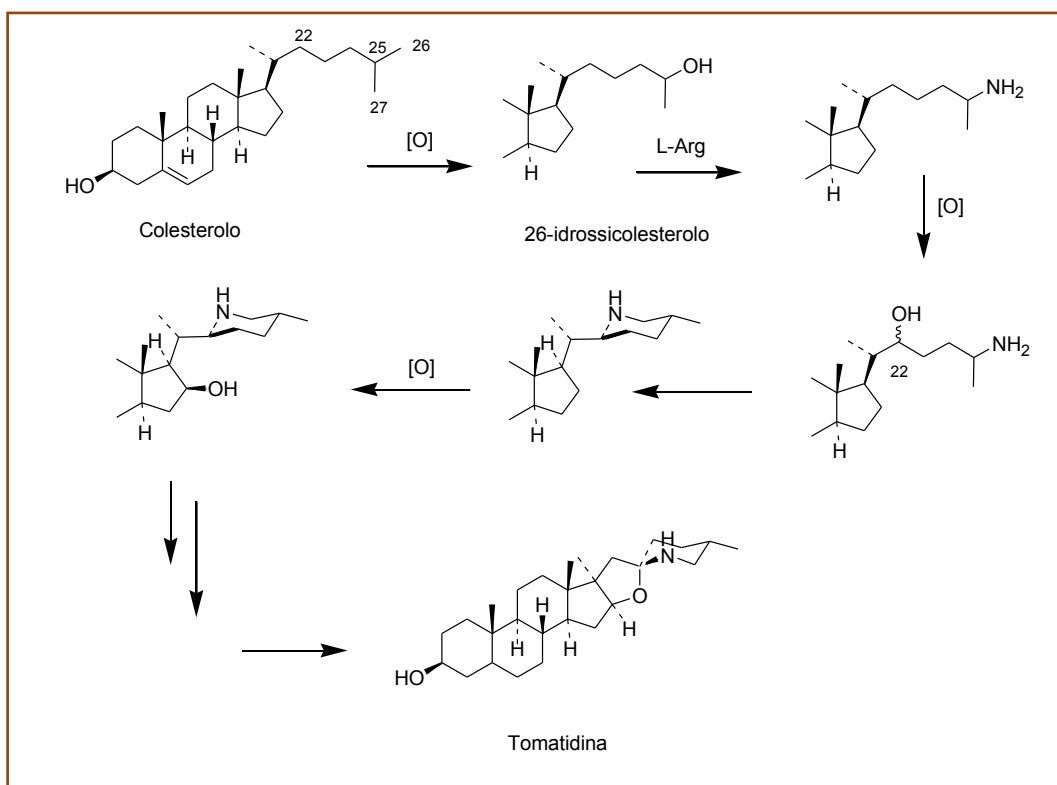
essere necessaria per la funzionalizzazione dei fitosteroli ed è, pertanto, caratteristica delle sole specie vegetali (Benveniste 2004). L'intervento dell'enzima obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi (CYP51), determina la rimozione del gruppo metilico in posizione C-14 dell'obtusifoliolo, con la conseguente formazione dell'intermedio 4 $\alpha$ -metil-ergosta-8,14,24(28)-trienolo; l'enzima CYP51 riesce a catalizzare tale reazione grazie alla precedente rimozione di uno dei due gruppi metilici in C-4 dell'obtusifoliolo, agendo, quindi, in maniera substrato-specifica (Rahier e Taton 1986). Il doppio legame in C-14 del 4 $\alpha$ -metil-ergosta-8,14,24(28)-trienolo viene ridotto, successivamente, dall'azione enzimatica di una sterolo reduttasi (FK) con la formazione del 4 $\alpha$ -metil-fecosterolo (Benveniste 2004). La sintesi dei fitosteroli avviene mediante una serie di ulteriori riarrangiamenti che prevedono, tra gli altri, la rimozione dell'ultimo gruppo metilico in C-4 per azione di una sterolo metilossidasi 2 (SMO2) (Darnet e Rahier 2004).

I principali meccanismi biochimici sopra descritti sono schematizzati in Figura 2.



**Figura 2** – Schema del pathway dei fitosteroli. Legenda: CAS1, cicloartenolo sintasi; SMT1, sterolo metil-transferasi 1; CYP51, obtusifoliolo 14 $\alpha$ -demetilasi; FK, sterolo C-14 reduttasi; SMO2, 4 $\alpha$ -metilossidasi.

Tra i prodotti del metabolismo dei fitosteroli c'è anche il colesterolo che, in pianta, non viene accumulato, ma va subito incontro a varie modificazioni strutturali della sua catena laterale, generando, tra gli altri, anche l'aglicone steroideo tomatidina, di cui rappresenta, infatti, il più diretto precursore (Friedman 2002) (Figura 3).



**Figura 3** - Schema della sintesi della tomatidina a partire dal colesterolo.

L'introduzione dell'atomo di azoto nell'anello F della molecola avviene mediante una reazione di amminazione utilizzando l'amminoacido L-arginina ed attraverso un processo di sostituzione a carico del substrato 26-idrossicolesterolo (Friedman 2002). Una seconda reazione di sostituzione determina la ciclizzazione del 26-ammino-22-idrossicolesterolo, generando l'anello piperidinico; in seguito si ha l'ossidrilazione in posizione 16 $\beta$ , mentre l'ammina secondaria viene ossidata ad immina, portando alla formazione dell'anello tetraidrofuranico (Dewick 1997).

Pare che l'ultima reazione a carico dell'aglicone consista nella sua glicosilazione mediante l'intervento di specifiche glicosiltransferasi (Stapleton *et al.* 1991).

Per quanto riguarda il pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina, si ipotizza che i suoi prodotti di degradazione vengano incanalati nei pathway biosintetici dei carotenoidi e della clorofilla (Eltayeb e Roddick 1984), e gli unici enzimi degradativi finora purificati, sono quelli prodotti da una serie di agenti fitopatogeni, e tra questi la tomatinasi extracellulare prodotta dal fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lairini *et al.* 1996).

Indagare i processi biochimici alla base della sintesi e della degradazione delle molecole biologiche è di fondamentale importanza per lo sviluppo di qualsiasi approccio molecolare volto alla regolazione dei livelli di sintesi e di accumulo di tali metaboliti.



## 1.5 Strategie per incrementare il contenuto dei metaboliti secondari

E' stato precedentemente sottolineato che le piante non costituiscono solo una fonte insostituibile di nutrienti essenziali quali carboidrati, proteine e grassi, ma rappresentano anche veri e propri "bioreattori" per la produzione di molecole bioattive (Georgiev *et al.* 2009). Tuttavia, a causa della complessità strutturale di suddette molecole ed in virtù del fatto che i loro pathway biosintetici sono spesso articolati e complessi, risulta particolarmente arduo ottenerne una produzione su larga scala come richiesto dall'industria farmaceutica, alimentare e chimica (Kolewe *et al.* 2008).

Attualmente, le strategie di produzione di metaboliti biologicamente attivi si basano sulla loro estrazione a partire da matrici vegetali, con il limite che, spesso, i composti di interesse sono presenti solo in basse percentuali rispetto al peso totale della pianta; inoltre non va sottovalutato il rischio di un rilevante danno ambientale dovuto al depauperamento delle piante da utilizzare a fini industriali. Alla luce di tali considerazioni, risulta evidente la necessità di ricercare nuove metodologie per l'ottenimento di principi attivi di origine vegetale nell'ottica di un abbattimento dei loro costi di produzione e di una maggiore competitività sul mercato in modo più eco-sostenibile.

Le numerose conoscenze che si sono acquisite negli ultimi anni nei settori della biologia molecolare e della biochimica, hanno acceso, oggi, a nuove sorgenti e/o metodi per ottimizzare la produzione di metaboliti secondari (Huang e McDonald 2009). Approcci biotecnologici come quelli basati sull'allestimento di colture *in vitro* di cellule, tessuti e piante intere, consentono di mettere a punto sistemi di produzione standardizzati e controllabili per rendere più efficiente la biosintesi di metaboliti di interesse con il vantaggio, tra gli altri, di ovviare alle problematiche della coltivazione in pieno campo dove spesso il materiale subisce variazioni qualitative/quantitative a causa di fattori biotici e/o abiotici (Smetanska 2008).

Sono numerosi gli esempi di approcci *in vitro* per l'ottimizzazione della produzione di metaboliti soprattutto di interesse farmacologico; colture cellulari della *Centella asiatica* vengono utilizzate per aumentare la sintesi dei centellosidi (Hernandez-Vazquez *et al.* 2010), cellule e tessuti del *Taxus* vengono impiegati per produrre in elevate quantità ed in tempi brevi il taxolo e altri metaboliti ad esso correlati (Exposito *et al.* 2009). Altri esempi riguardano l'impiego delle colture cellulari della *Psoralea corylifolia* per aumentare la produzione di fitoestrogeni (Shinde *et al.* 2009) e l'uso di cellule e tessuti di specie, quali ad esempio le leguminose, per la produzione su larga scala dei ciclotidi, peptidi ad azione antimicrobica (Dörnenburg 2008).

Alle colture *in vitro* è spesso associato anche l'impiego di elicitori, molecole di natura biotica o abiotica in grado di stimolare le risposte di difesa delle piante e, quindi, di attivarne il

metabolismo secondario (Karuppusamy 2009); tra gli elicitori naturali ritroviamo le pectine, il chitosano, l'acido salicilico e il metiljasmonato (El-Sayed e Verpoorte 2002). Yendo *et al.* (2010) hanno dimostrato, ad esempio, che il trattamento con metiljasmonato di tessuti di numerose specie vegetali comporta una maggiore espressione dei geni chiave per la biosintesi dei triterpeni con conseguente aumento del contenuto di saponine triterpenoidiche. Inoltre, piante di *Nigella sativa* allevate in coltura idroponica e trattate con metiljasmonato producono una maggiore quantità di saponine in seguito all'attivazione, da parte dell'elicitore, del gene della  $\beta$ -amirina sintasi (Scholz *et al.* 2009). Anche plantule di *Glycyrrhiza glabra* allevate *in vitro* su substrati arricchiti con acido salicilico e metiljasmonato producono maggiori quantità di glicirrizina rispetto alle piante controllo (Shabani *et al.* 2009).

Tra gli approcci biotecnologici di più recente affermazione per la produzione di metaboliti *in planta* rientra, senza dubbio, l'ingegneria metabolica (Wu e Chappell 2008). Quest'ultima si avvale di tecniche di trasformazione genetica sempre più avanzate e delle conoscenze di base dei meccanismi che regolano la sintesi e l'accumulo dei metaboliti, al fine di utilizzare piante intere non solo per la produzione più efficiente di molecole bioattive, ma anche per la sintesi di molecole esogene quali anticorpi e vaccini (Abdullah *et al.* 2008). Questo sistema offre numerosi vantaggi rispetto all'impiego di fermentatori o reattori tradizionali quali: l'abbattimento dei costi di produzione in virtù della grande quantità di biomassa prodotta dalle piante, la maggiore sicurezza del prodotto da destinare sul mercato, la semplicità delle tecniche di allevamento e di processamento del materiale vegetale (Sharma e Sharma 2009).

Numerosi approcci di ingegneria metabolica si basano sull'isolamento e sulla regolazione, mediante tecniche di overespressione e/o silenziamento, di geni endogeni codificanti per enzimi chiave dei pathway biochimici studiati, ma anche sul trasferimento di geni esogeni al fine di modulare i livelli di sintesi dei metaboliti di interesse (Lessard *et al.* 2002).

Approcci di ingegneria metabolica hanno consentito di aumentare la concentrazione dei composti volatili responsabili dei meccanismi di difesa delle piante, del profumo, dell'aroma e della qualità dei fiori e dei frutti (Duradeva e Pichersky 2008); il clonaggio e la regolazione dei geni codificanti per gli enzimi della  $\beta$ -carotene idrossilasi e  $\beta$ -carotene chetolasi, coinvolti nel pathway dei chetocarotenoidi (astaxantina e cantaxantina), hanno consentito di implementare la produzione di tali metaboliti in specie di interesse agrario quali pomodoro (*Solanum lycopersicum*), patata (*Solanum tuberosum*), carota (*Daucus carota*) e mais (*Zea mays*) (Zhu *et al.* 2009). Piante di *Brassica napus* sono state trasformate con sei geni batterici del pathway dei carotenoidi consentendo di incrementare di circa 30 volte il contenuto di tali metaboliti nei semi di canola (Fujisawa *et al.* 2009). Approcci di ingegneria metabolica sono stati messi a punto anche in

*Catharanthus roseus* al fine di ottimizzare la produzione, generalmente molto bassa, degli alcaloidi terpenoidi indolici (TIA) quali aimalicina, vinblastina e vincristina, utilizzati a scopo farmacologico (Zhou *et al.* 2009). Il trasferimento e l'overespressione in *Nicotiana tabacum* del gene dell'allene ossido ciclastasi (AOC) isolato dalla pianta erbacea *Hyoscyamus niger* ha consentito di incrementare di circa 5 volte il contenuto di nicotina rispetto alle piante controllo (Jiang *et al.* 2009). In riso è stato possibile aumentare il contenuto di isoflavonoidi mediante l'overespressione e la caratterizzazione funzionale del gene *OsIRL* (isoflavone reductasi) (Kim *et al.* 2010).

Tuttavia, spesso, i risultati degli interventi di ingegneria metabolica possono essere poco prevedibili a causa della complessità dei network metabolici e delle scarse conoscenze dei loro singoli step e del modo in cui essi vengono regolati; l'overespressione di un gene codificante un enzima chiave può non avere alcun effetto sull'aumento del contenuto di un determinato metabolita, ma può portare solo all'aumento di espressione del gene stesso o alla produzione di composti assolutamente nuovi con effetti non sempre positivi. Ad esempio, l'overespressione in *Arabidopsis thaliana* del fattore di trascrizione NGATHA isolato in *Brassica rapa*, determina una forte riduzione dello sviluppo e della crescita degli organi della pianta (Kwon *et al.* 2009). Allo stesso modo, strategie basate sul silenziamento di geni chiave di determinati meccanismi biochimici possono alterare la normale fisiologia dell'organismo; ad esempio, silenziando il gene dell'adenosina-59-fosfosolfato chinasi in *Arabidopsis*, si ottiene una forte riduzione della sintesi dei metaboliti solfati, con conseguente alterazione dei livelli di crescita della pianta (Mugford *et al.* 2009).

Sulla base di tali considerazioni risulta necessario creare una stretta connessione tra lo studio dei meccanismi biochimici e la formulazione di modelli che siano in grado di predire il comportamento dei network metabolici in termini di flusso e concentrazione delle molecole di interesse. Già nel 2003, Morandini e Salamini definirono l'Analisi del Controllo Metabolico (ACM) come uno strumento in grado di descrivere i pathway biochimici e il modo in cui essi vengono regolati, al fine di rendere più efficaci gli interventi di ingegneria metabolica. Oggi, lo studio dei flussi metabolici viene inserito nel contesto della "system biology", disciplina che nasce dall'interconnessione tra i campi della genomica, della trascrittomica e, appunto, della metabolomica al fine di creare una visione globale dei processi molecolari e biochimici che regolano la vita e lo sviluppo degli organismi (Fukushima *et al.* 2009). Esempi di approcci di tal genere sono riportati in letteratura; Mounet e collaboratori (2009), mediante analisi microarray, sono riusciti a creare una correlazione trascrittoma-metaboloma caratterizzando i network metabolici che entrano in gioco nelle prime fasi della maturazione del frutto del pomodoro ed identificando nuovi geni chiave per la loro regolazione. Sempre in pomodoro è stato condotto uno

studio simile con lo scopo di identificare i geni ed i meccanismi metabolici che determinano la sintesi di molecole quali flavonoidi, glicocalcoidi e terpenoidi nei tessuti cuticolari della pianta in diversi stadi del suo sviluppo (Mintz-Oron *et al.* 2008).

La necessità di studiare i processi metabolici non più come singoli meccanismi ma come parte integrante di un sistema molecolare complesso, richiede anche il supporto di tecniche appropriate a tali scopi; risonanza magnetica nucleare (NMR), cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC), sono solo alcune delle metodiche analitiche che trovano spazio, oggi, nel campo della metabolomica (Issaq *et al.* 2009).

Le potenzialità dell'ingegneria metabolica saranno sempre maggiori quanto più saranno numerose le informazioni fornite dai settori della genomica, della trascrittomica e della metabolomica, fino ad arrivare al "Metabolomics-Assisted Breeding", e quindi alla possibilità di creare programmi di miglioramento genetico tenendo conto dei profili metabolici delle specie di interesse da poter utilizzare per la costituzione di nuovi biotipi ad elevato valore nutrizionale e qualitativo (Ferne e Schauer 2008).

Bisogna comunque considerare che, al di là degli approcci biotecnologici che si possono mettere in atto negli studi di metabolomica, la delucidazione e la conoscenza dei meccanismi di regolazione dei pathway biochimici non può prescindere dallo studio e dalla caratterizzazione funzionale dei loro geni chiave (Manichaikul *et al.* 2009).

## **1.6 Obiettivi del lavoro sperimentale**

Il presente lavoro di dottorato, svolto nell'ambito di una collaborazione tra il DISSPAPA (Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II ed il CNR-Istituto di Genetica Vegetale, si è proposto di indagare il pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro, mediante l'isolamento e lo studio trascrizionale e funzionale di alcuni geni chiave in esso coinvolti.

In particolare, l'attività di ricerca è stata finalizzata allo:

- studio dei geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina;
- studio dei geni coinvolti nel pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina.

Per il perseguimento del primo obiettivo si è deciso di effettuare l'identificazione, il clonaggio e la caratterizzazione di cinque geni coinvolti nelle prime fasi della biosintesi del glicocalcoide.

Per quanto concerne il secondo punto, il nostro obiettivo è stato quello di identificare un gene del pomodoro che potesse essere coinvolto nella degradazione dell' $\alpha$ -tomatina *in planta* e di mettere a punto strategie di genomica funzionale (overespressione e/o silenziamento) volte a confermare il ruolo del putativo gene.

I risultati conseguiti con la presente tesi di dottorato apriranno la strada ad una più approfondita conoscenza del pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina e rappresenteranno un valido punto di partenza per le applicazioni di strategie di ingegneria metabolica finalizzate alla regolazione del contenuto di questo glicoalcaloide in pomodoro.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiale vegetale

Per l'isolamento e lo studio di espressione dei geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina, sono state utilizzate piante di *S. lycopersicum* cultivar San Marzano (SM) e sei specie selvatiche di pomodoro: *S. chmielewskii*, acc. LA1327, *S. habrochaites*, acc. LA1777, *S. lycopersicoides*, acc. LA2951, *S. neorickii*, acc. LA2133, *S. pennellii*, acc. LA0716 e *S. pimpinellifolium*, acc. LA1589. I semi sono stati fatti germinare *in vitro* in acqua sterile previa sterilizzazione in etanolo 80% (v/v) per 15 min ed ipoclorito di sodio al 3% per 20 min e lavaggi in acqua sterile. Le piante sono state allevate in serra in condizioni di fotoperiodo naturale.

Per lo studio funzionale del gene *LeXYL1* sono state utilizzate piante di *S. lycopersicum* cultivar M82; la sterilizzazione dei semi è stata effettuata secondo quanto descritto nel protocollo di trasformazione (2.13).

### 2.2 Isolamento e clonaggio del gene *CAS1*

L'RNA totale è stato estratto da giovani foglie di SM utilizzando il kit "RNeasy Plant Mini Kit" della Qiagen (Hilden, Germany). Il cDNA è stato trascritto partendo da una quantità di 5 µg di RNA utilizzando 1 µl della SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen, CA, USA) ed aggiungendo 1 µl di primer oligo dT 50 µM (Invitrogen, CA, USA) in un volume finale di 20 µl. La strategia di clonaggio del gene *CAS1* è stata basata su PCR Nested con l'impiego di una coppia di primer degenerati disegnata sulle regioni amminoacidiche conservate tra le cicloartenolo sintasi di pianta reperibili in banca dati. La coppia di primer usata è stata 711A (5'-CKRTAYTCXCCXARXGCCCADATXGGRAA-3') e 161S (5'-GAYGGXGGXTGGGGXYTXCA-3'); la reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando 3 µl di cDNA in un volume finale di 25 µl ed applicando il seguente ciclo di temperature: 1 min a 94°C, 2 min a 42°C, 3 min a 72°C, fasi ripetute per 35 volte e seguite da uno step finale di 10 min a 72°C. Il prodotto PCR ottenuto è stato clonato all'interno del vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* e sequenziato presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania). Per il clonaggio della sequenza completa del gene *CAS1*, si è proceduto all'allestimento delle reazioni 3' e 5' RACE-PCR (Rapid Amplification of the CDNA Ends) utilizzando il kit "Smart™ RACE cDNA Amplification kit" (Clontech, Palo Alto, CA, USA) ed i primer specifici CAS-RACE1 (5'-

TGCCCAAGAGCCATACCATACCATGAGC-3') e CAS-RACE2 (5'-GAGCTAATCAACCCTGCTGAGC-3') rispettivamente per l'estensione della sequenza in direzione 3'e 5'. Per l'ottenimento del cDNA "full-length" di *CAS1* sono stati disegnati i primer specifici CAS3 (5'-GTCGAGTTTTGAAGTATCATC-3') e CAS5 (5'-GAAGAATGTGGAAGTTGAAAG-3') ed è stato messo a punto il seguente ciclo di amplificazione: 1 ciclo di 5 min a 94°C , 30 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 5 min a 72°C, e uno step finale di 10 min a 72°C. Il prodotto PCR ottenuto è stato clonato all'interno del vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* e sequenziato presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania).

### 2.3 Analisi di espressione del gene *CAS1* in risposta a stress luminoso

Per lo studio dell'espressione del gene *CAS1* in risposta a stress luminoso sono state utilizzate sei piante di SM; tre piante sono state allevate in armadio climatico con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio ad una temperatura di 25°C, mentre le rimanenti sono state allevate in armadio climatico in condizioni di buio continuo ad una temperatura di 25°C. L'estrazione dell'RNA totale da foglia e la sintesi del cDNA sono stati ottenuti come precedentemente descritto. Per l'analisi RT-PCR semiquantitativa è stata usata la coppia di primer CASintF (5'-GGCATGAAAATGAAGGGGTAC-3') e CASintR (5'-CCTTGAGAGTTCATATGTTGC-3') ed è stato utilizzato il seguente ciclo di temperature: 1 ciclo di 5 min a 94°C , 35 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1 min a 72°C, e uno step finale di 10 min a 72°C. Per la standardizzazione è stata amplificata una regione dell'rRNA 18S utilizzando i primer S1 (5'-TAGATAAAAGGTGCGACGG-3') e S2 (5'-CCCAAAGTCCAACACTACGAGC-3').

### 2.4 Isolamento e caratterizzazione strutturale del gene *SMT1*

L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Il clonaggio del gene *SMT1* è stato effettuato tramite approccio di PCR Nested con l'impiego di due coppie di primer degenerati: la prima costituita dai primer SMT1F (5'-GGNTGGGGNGARWSNTTYCAYTT-3') e SMT1R (5'-RTCNARNGGNARRTACCANGG-3') e la seconda costituita dai primer SMT2F (5'-GTNYTNGAYGTNGGNTGYGGNAT-3') e SMT2R (5'-TCDATNGCRTANACNGCRTCAA-3'). La reazione di amplificazione è stata portata avanti

utilizzando 4 µl di cDNA in un volume finale di 25 µl; è stato allestito il seguente ciclo di temperature: 1 min a 94°C, 2 min a 42°C, 3 min a 72°C, fasi ripetute per 35 volte e seguite da uno step finale di 10 min a 72°C. Due µl del prodotto PCR purificato sono stati utilizzati per la seconda reazione Nested utilizzando lo stesso ciclo di amplificazione del primo ciclo di PCR. Il prodotto ottenuto è stato clonato nel vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* ed inviato al sequenziamento presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania). La sequenza ottenuta è stata utilizzata per effettuare un'analisi BLAST nel database dell'SGN (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>). Per l'ottenimento del CDS, sulla sequenza del clone con la più alta omologia sono stati disegnati ed utilizzati due primer specifici, SMT7 (5'-CCGTTTTGGCATTTCCTTTTCC-3') e SMT8 (5'-GCAAACAATTAGGAGTTGAGAAG-3').

Per il gene *SMT1* si è proceduto anche al clonaggio della regione genomica utilizzando la stessa coppia di primer impiegata per il clonaggio del CDS. Il DNA genomico è stato estratto da foglie giovani di pomodoro secondo quanto riportato nel protocollo del kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Germany). Il sequenziamento del clone è avvenuto con un approccio "walking primer" presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania).

## 2.5 Isolamento e clonaggio del gene *CYP51*

L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Come riportato per il gene *SMT1*, anche per il clonaggio di *CYP51* è stata messa a punto una strategia basata su omologia mediante Nested PCR. La prima reazione di amplificazione è stata effettuata con i primer CYP1F (5'-GTNGTNTTYGAYGTNGAYTAY-3') e CYP1R (5'-CCADATNCCYTTDATYTGAR-3'), mentre la seconda reazione di amplificazione è stata allestita utilizzando la coppia di primer CYP2F (5'-CCNTAYYTNCNATHCCNGCN-3') e CYP2R (5'-YTCYTTDATRCANCKRTANAR-3'). Sulla sequenza parziale del gene sono stati disegnati i primer specifici per la messa a punto della 5' e della 3' RACE-PCR. Per la 5' RACE è stato disegnato il primer CYP-5'R (5'-CCTATCAGGGTCGTAAGTATCTGGATTC-3'), mentre per la 3' RACE il primer CYP-3'F (5'-CGTACAGGCAAGGCAGAGAATGATATG-3'). Le PCR RACE sono state allestite secondo quanto riportato dal protocollo del kit "Smart<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification" (Clontech, Palo Alto, CA, USA). La sequenza completa del gene *CYP51* è stata ottenuta mediante una reazione PCR effettuata con la coppia di primer CYP5 (5'-CTCCACTATGACTATCATTATTC-3') e CYP3 (5'-CATGCAATGTTATCTGCTTATTC-3') ed allestendo il seguente ciclo di temperature: 5 min a 94°C, 1 min a 94°C, 1 min a 57°C, 3 min a



72°C, fasi ripetute per 35 volte e seguite da uno step finale di 10 min a 72°C. Il prodotto PCR è stato clonato all'interno del vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* e sequenziato presso MWG-Biotech AG (Ehriberg, Germania).

## 2.6 Isolamento e clonaggio del gene *FK*

L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Partendo dalla sequenza del gene di *Arabidopsis thaliana* codificante per una sterolo C-14 reduttasi (acc. number BT000546), è stata effettuata un'analisi BLAST nel database dell'SGN (<http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>) per disegnare due primer specifici sul clone di pomodoro che presentava maggiore omologia per l'amplificazione delle regioni al 3' e al 5' della sequenza. Le 3' e 5' RACE-PCR sono state allestite secondo quanto riportato dal protocollo del kit "Smart™ RACE cDNA Amplification" (Clontech, Palo Alto, CA, USA) utilizzando i primer FK3 (5'-GGTATGATGGGATGGTTACTTATCAATC-3') e FK5 (5'-GGACTACCCCATATGGGTGCCTTGG-3'). La sequenza completa del gene *FK* è stata ottenuta tramite una reazione PCR con l'impiego dei primer FKFL5 (5'-GATACTGAACTTGAACCTTC-3') e FKFL3 (5'-CAAGCAGCACATTTAAATCC-3') disegnati rispettivamente sulle regioni N- e C-terminale della sequenza; è stato messo a punto il seguente ciclo di temperature: 5 min a 94°C, 1 min a 94°C, 1 min a 51°C, 3 min a 72°C, fasi ripetute per 35 volte e seguite da uno step finale di 10 min a 72°C. Il prodotto PCR ottenuto è stato clonato nel vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* e sequenziato presso MWG-Biotech AG (Ehriberg, Germania).

## 2.7 Isolamento e clonaggio del gene *SMO*

L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Per il clonaggio del gene *SMO* si è partiti da una EST di pomodoro (EST416063) reperita in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sulla base di questa sequenza è stato disegnato il primer specifico SMOF (5'-GAAAGGGCAGGATGGTTGAGC-3') per l'ottenimento della regione al 3'. La 3' RACE-PCR è stata messa a punto secondo quanto riportato dal protocollo del kit "Smart™ RACE cDNA Amplification" (Clontech, Palo Alto, CA, USA). La sequenza completa del gene *SMO* è stata ottenuta tramite PCR utilizzando i primer SMOFLfor (5'-CCGGCGATTGGGTCAAACC-3') e SMOFLrev (5'-CTTGCAATGCCGGACCAGC-3')

disegnati rispettivamente sulle regioni N- e C-terminale; è stato adottato il seguente ciclo di amplificazione: 5 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 3 min a 72°C, seguiti da uno step finale di 10 min a 72°C. Il prodotto PCR è stato clonato all'interno del vettore pCR2.1 (Invitrogen, CA, USA) in *E. coli* per essere, poi, sequenziato presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania).

## 2.8 RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto da tre diversi organi (foglia, frutto verde e frutto rosso) di *S. lycopersicum* e da foglie di sei specie selvatiche di pomodoro (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. neorickii*, *S. pennellii* e *S. pimpinellifolium*) secondo quanto precedentemente descritto. Per l'analisi RT-PCR semiquantitativa, l'RNA totale è stato utilizzato come stampo per la sintesi del cDNA, come precedentemente riportato. Sono stati disegnati primer specifici per l'amplificazione dei geni *CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* (Tabella 3). Per l'amplificazione è stato adottato il seguente ciclo di amplificazione: 1 ciclo di 5 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1 min alla specifica T<sub>m</sub> di ciascuna coppia di primer (Tabella 3), 1 min a 72°C, e uno step finale di 10 min a 72°C. Per la standardizzazione sono state condotte le reazioni di amplificazione con i primer S1 (5'-TAGATAAAAGGTCGACGCGG-3') e S2 (5'-CCCAAAGTCCAACACTACGAGC-3').

**Tabella 3** - Elenco dei primer utilizzati negli esperimenti di RT-PCR semiquantitativa per l'amplificazione dei geni *CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* di *S. lycopersicum*.

Gene	Primer	Sequenza	T <sub>m</sub> (°C)
<i>CAS1</i>	CASintF	5'-GGCATGAAAATGAAGGGGTAC-3'	57,9
	CASintR	5'-CCTTGAGAGTTCATATGT TGC-3'	55,9
<i>SMT1</i>	SMT1RTF	5'-GGTTGGAGGAAGAATTGGCAAG-3'	66
	SMT1RTR	5'-CCAACCGGATCTGGTGCATG-3'	64
<i>CYP51</i>	CYP51RTF	5'-GTCCTCTACAGATGCATAAAGG-3'	64
	CYP51RTR	5'-GGCGAGATCAGTTCAAACCTGG-3'	64
<i>FK</i>	FKRTF	5'-CGCAGATGAATCTTGTTTCACC-3'	64
	FKRTR	5'-CCATGTGGAGGTCATGAACTC-3'	64
<i>SMO</i>	SMORTF	5'-CACTCGCCTGTTGCTGTATC-3'	62
	SMORTR	5'-GTGTAGAGCAGTCGGTGATG-3'	62

## 2.9 Identificazione del gene *LeXYL1*

L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Per l'identificazione di *LeXYL1*, la sequenza U24701 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) del gene codificante per una tomatinasi in *Septoria lycopersici* è stata blastata sul genoma di *S. lycopersicum* disponibile presso il sito dell'SGN (<http://solgenomics.net>) consentendo di identificare il gene di pomodoro *LeXYL1* (acc. number AB041811) codificante per una  $\beta$ -D-xilosidasi.

## 2.10 Real Time PCR del gene *LeXYL1*

L'estrazione dell'RNA totale da foglia, frutto verde e frutto rosso di *S. lycopersicum* cv. SM e var. *cerasiforme* (LA2213) e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. I semi di *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LA2213) sono stati reperiti presso il Tomato Genetics Resource Center dell'Università della California, Davis (<http://tgrc.ucdavis.edu>). L'analisi quantitativa mediante Real Time PCR (qRT-PCR) del gene *LeXYL1* è stata allestita utilizzando la Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, UK) e tubi ottici ABI Prism (Applied Biosystems, UK). Per ogni campione sono stati utilizzati 10  $\mu$ l di Power SYBR Green Master Mix, 2  $\mu$ l di cDNA e 200nM di ciascun primer specifico in un volume finale di 20  $\mu$ l. I primer specifici LeXYL1-qRT-Fw (5'-GACGTTGTTCCAATGACTGATATGA-3') e LeXYL1-qRT-Rev (5'-GTCCTGCCAGGGTAGTTTGTG-3') sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express ver. 2.0 (Applied Biosystems, UK). Il ciclo di amplificazione è stato impostato come segue: 1 ciclo di 2 min a 50°C, 1 ciclo di 10 min a 95°C, 40 cicli di 15 sec a 95°C e 1 ciclo di 1 min a 59°C. I dataplots sono stati analizzati mediante il software ABI Prism 7000 Sequence Detection System ver. 1.2.3 (Applied Biosystems, UK). Per ogni campione sono state allestite tre repliche tecniche e i livelli di espressione relativi sono stati calcolati mediante i valori del  $\Delta\Delta C_t$ . Il gene dell'actina è stato utilizzato come controllo interno utilizzando i primer Act-QRT-For (5'-AGGTATTGTGTTGGACTCTGGTGAT-3') e Act-QRT-Rev (5'-ACGGAGAATGGCATGTGGA-3').

## 2.11 Analisi funzionale del gene *LeXYL1*: strategia dell'overespressione

Per l'overespressione del gene *LeXYL1* è stato utilizzato il vettore PG0029 ed il promotore costitutivo del gene 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) (<http://www.pgreen.ac.uk>) (Figura 4). A tale scopo, il gene *LeXYL1* è stato clonato all'interno della cassetta p35S previa reazione PCR effettuata per creare i siti di restrizione per gli enzimi *SacI* e *XbaI* rispettivamente al 5' ed al 3' della sequenza amplificata. La reazione è stata condotta in un volume finale di 25 µl utilizzando 2,5 µl di buffer contenente MgCl<sub>2</sub>, 4 µl di dNTP (10mM), 1 µl di ciascun primer (50mM), 2 µl di cDNA estratto da tessuto fogliare di *S. lycopersicum* e 0,25 µl di enzima LA Taq (5 U/µl) (TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup>, Lonza, Svizzera). Sono stati utilizzati i primer LeXYL1ADAP3 (5'-CATGAGCTCAATCCTCACAGTTAAGG-3') e LeXYL1ADAP5 (5'-CATTCTAGAATGAATGACATAGGAATGG-3') ed il seguente ciclo di temperature: 1 ciclo di 5 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 2 min e 30 sec a 72°C e uno step finale di 10 min a 72°C.

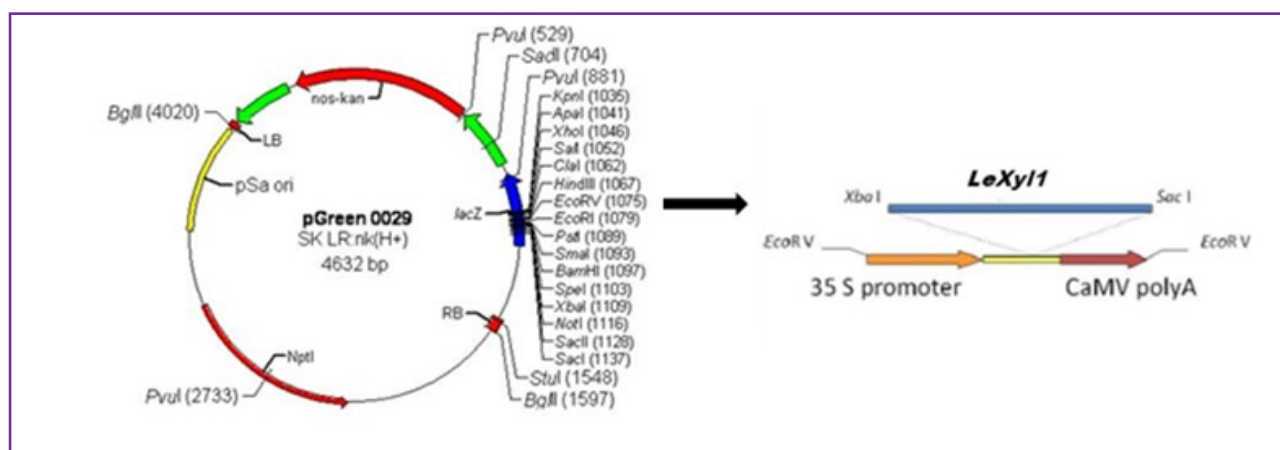
Per effettuare l'inserimento di *LeXYL1* con i siti di restrizione enzimatici nella cassetta p35S, è stata eseguita la linearizzazione di quest'ultima con gli enzimi *SacI* e *XbaI*. I prodotti delle reazioni di digestione sono stati purificati da gel d'agarosio utilizzando il kit "QIAquick Gel Extracion" (Qiagen, Hilden, Germany) e quantizzati.

Una volta effettuata la quantizzazione, si è proceduto alla reazione di ligazione del gene *LeXYL1* all'interno della cassetta p35S; a tale scopo, è stato utilizzato il kit "TA Cloning" (Invitrogen, CA, USA) mettendo a punto la seguente miscela di reazione: 3 µl di buffer 10X, 2 µl dell'enzima T4 ligasi (5 U/µl), 7,5 µl di *LeXYL1* ADAP (8ng/µl), 7,5 µl di vettore pCR2.1 contenente la cassetta 35S (8ng/µl), 10 µl di acqua. La reazione è stata incubata a 14°C per tutta la notte. Il prodotto della reazione di ligazione è stato utilizzato per la trasformazione di cellule competenti "TOP10" di *E. coli* (Invitrogen, CA, USA) secondo quanto riportato dal protocollo del kit "TA Cloning" (Invitrogen, CA, USA); le cellule sono state incubate a 37°C per tutta la notte. Le colonie putativamente positive sono state analizzate mediante due reazioni PCR, una per verificare la presenza del promotore 35S utilizzando i primer 35SFW (5'-ATTGATATCCTACCCCTACTCCAAAAATG-3') e 35SRev (5'-AGTGAATTCGGGCTGTCCTCTCCAAATG-3'), l'altra per verificare la presenza del gene *LeXYL1* usando i primer LeXyl539Fw (5'-TTGCCAAGGGACCTGTAATCC-3') e LeXyl539Rev (5'-ATGGACTGAGGGTGGTGAAG-3').

Il pDNA estratto dai cloni di *E. coli* contenente il plasmide pCR2.1 35S::*LeXYL1* ed il vettore PG0029 (<http://www.pgreen.ac.uk>) sono stati sottoposti a reazione di digestione con

l'endonucleasi di restrizione *EcoRV* ed è stata successivamente allestita la seguente reazione di ligazione: 3 µl di buffer 10X, 2 µl di enzima T4 ligasi (5 U/µl), 60 ng di vettore PG0029, 60 ng di pCR2.1 35S:: *LeXYL1* in un volume finale di 30 µl. La reazione è stata incubata a 14°C per tutta la notte. Il vettore pG35S:: *LeXYL1* è stato trasferito in *E. coli* ("TOP10", Invitrogen, CA, USA) secondo il protocollo del kit "TA Cloning" (Invitrogen, CA, USA) e su alcune colonie sono state effettuate analisi PCR per l'identificazione di quelle trasformate. Per verificare la corretta sequenza del gene *LeXYL1*, il plasmide estratto dalle colonie positive è stato sottoposto a sequenziamento presso MWG-Biotech AG (Ehiriberg, Germania).

Il vettore pG35S:: *LeXYL1* estratto dalle cellule di *E. coli* risultate positive alla trasformazione è stato trasferito in cellule di *A. tumefaciens*, ceppo LBA4404. La trasformazione delle cellule LBA4404 è stata effettuata tramite elettroporazione utilizzando 1µg di vettore pG35S:: *LeXYL1* e 1µg di vettore pSOUP (Invitrogen, CA, USA); le cellule sono state incubate a 28°C per 48 h.



**Figura 4** - Mappa del plasmide PG0029 (<http://www.pgreen.ac.uk/JIT/pG0029.htm>) in cui è stata inserita la cassetta 35S:: *LeXYL1*.

## 2.12 Analisi funzionale del gene *LeXYL1*: strategia del silenziamento

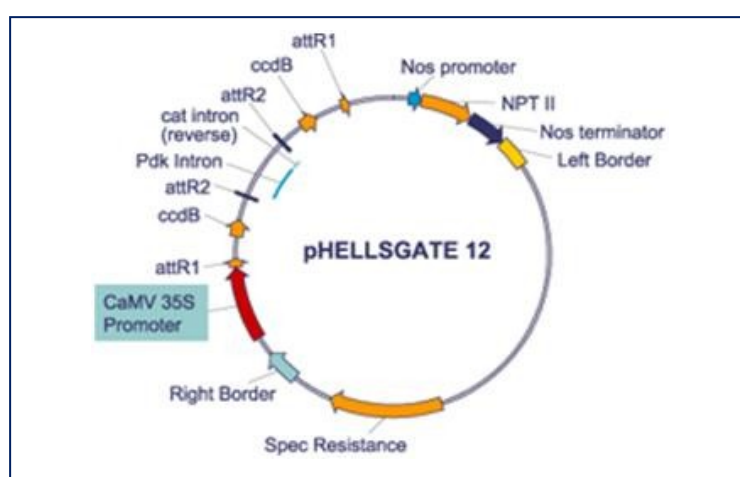
Per il silenziamento del gene *LeXYL1* è stata messa a punto una strategia basata su "RNA interference" (RNAi). Per il trasferimento costitutivo in pianta del costrutto RNAi è stato scelto il vettore di destinazione pHellsGate12 (<http://www.csiro.au/org/PI.html>) (Figura 5), la cui sequenza nucleotidica è depositata in banca dati (acc. number AF489904). Ai primer specifici per l'amplificazione del gene *LeXYL1*, LeXYL1RNAiFw (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGCAGACGTTGTTCCAATG-3') e

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTGGCGCTTTATCAAGATG-3') sono state aggiunte le sequenze adattatrici ATTB1 (forward) e ATTB2 (reverse). I frammenti amplificati sono stati purificati ed inseriti nel plasmide di entrata pDonr/Zeo (Invitrogen, CA, USA) tramite l'enzima "BP clonase II" (Invitrogen, CA, USA) attraverso un'incubazione a 25°C per 12-16 h. Il prodotto della ricombinazione è stato trasformato in cellule competenti di *E. coli* "TOP10" (Invitrogen, CA, USA). Le colonie putativamente positive alla trasformazione sono state verificate mediante PCR utilizzando la stessa coppia di primer disegnata per la sequenza bersaglio da silenziare. I plasmidi ricombinanti (pEntry-*LeXYL1*) sono stati estratti mediante il "Qiagen Plasmid Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) e quantizzati.

Trecento ng di pEntry-*LeXYL1* sono stati usati con 150 ng del vettore di destinazione pHellsgate12 nella reazione di ricombinazione utilizzando l'enzima "LR clonase II" (Invitrogen, CA, USA) e attraverso un'incubazione a 25°C per 12-16 h; il prodotto della ricombinazione è stato trasformato in cellule competenti di *E. coli* "TOP10" (Invitrogen, CA, USA).

Il vettore ricombinante (pHG-*LeXYL1*) è stato estratto dalle cellule di *E. coli* risultate positive alla trasformazione per essere, poi, trasferito in cellule di *A. tumefaciens*, ceppo elettrocompetente LBA4404.

Per lo studio funzionale del gene *LeXYL1* sotto il controllo di promotori non costitutivi, sono stati scelti promotori frutto-specifici dei geni della fosfoenolpiruvato carbossilasi 2 (PPC2) e della poligalatturonasi (PG) (Fernandez *et al.* 2009). La strategia di costruzione delle cassette RNAi ha previsto le stesse fasi descritte per il silenziamento costitutivo del gene *LeXYL1*.



**Figura 5** - Mappa del vettore di destinazione pHellsgate 12 (<http://www.csiro.au/org/PI.html>) utilizzato negli esperimenti RNAi.

### **2.13 Trasformazione della cultivar M82 di pomodoro**

Per ogni costrutto da trasferire in pianta sono stati posti a germinare 120 semi di pomodoro varietà M82. La sterilizzazione dei semi è stata effettuata con un primo trattamento in etanolo al 70% per 5 min seguito da due lavaggi in ipoclorito di sodio al 10% + 0,1% di SDS per 10 min e da cinque lavaggi in acqua sterile. Una volta sterilizzati, i semi sono stati trasferiti su substato MS30B5 (Tabella 4) e posti in camera di crescita alla temperatura di 25°C per circa 7-10 gg utilizzando un fotoperiodo di 16 h di luce ed 8 h di buio.

Dopo 8-10 gg, i cotiledoni sono stati tagliati e preparati per la procedura di trasformazione. L'inoculo di agrobatterio è stato fatto crescere in 5 ml di mezzo di coltura YEP (Tabella 4) e selezione antibiotica per circa 48 h, fino al raggiungimento di una densità ottica di circa 1,0 OD; in seguito, l'inoculo è stato centrifugato e risospeso in mezzo di coltura MSO (Tabella 4) contenente acetosiringone (0,075 mg/ml) per aumentarne la virulenza. Una volta diluita fino ad un OD di circa 0,8, la sospensione batterica è stata subito impiegata per i 30 min di co-coltura con gli espianti di pomodoro precedentemente tagliati. Al termine della co-coltura, gli espianti sono stati asciugati su carta assorbente sterile e successivamente posti su mezzo MS30 (Murashige e Skoog 1962) (Tabella 4) contenente acetosiringone (0,075 mg/ml) ed incubati in camera di crescita per 48 h a 25°C al buio. In seguito all'incubazione, gli espianti sono stati trasferiti su mezzo di rigenerazione MPF1 (Tabella 4) arricchito degli specifici antibiotici per essere nuovamente incubati a 25°C per tre settimane. Al termine delle tre settimane, sono stati eliminati i calli dagli espianti rigenerati che sono stati trasferiti sul mezzo MPF2 (Tabella 4) arricchito con gli antibiotici carbenicillina (500 mg/L) e kanamicina (100 mg/L); i germogli ottenuti dagli espianti rigenerati, infine, sono stati trasferiti su substrato di radicazione MS30B5 (Tabella 4).

**Tabella 4** - Composizione dei substrati utilizzati per la trasformazione con *A. tumefaciens* degli espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum*.

Substrato	Componente	Quantità	pH
YEP	Tryptone	10 g/L	7.5
	Estratto di lievito	10 g/L	
	NaCl	5,0 g/L	
MSO	Sali MS	4,30 g/L	5.8
	Tiamina	0,4 mg/L	
	Myo-inositolo	10 mg/L	
	Saccarosio	30 g/L	
MS30B5	Sali MS	4,30 g/L	5.8
	Vitamina Nitsck	1,0 mg/L	
	Saccarosio	30 g/L	
	Plant Agar	2,0 g/L	
	Zeatina Riboside	1,0 g/L	
MPF1	Sali MS	4,30 g/L	5.8
	Vitamina Nitsck	1,0 ml/L	
	Saccarosio	20 g/L	
	Plant Agar	2,0 g/L	
	Zeatina Riboside	5,0 g/L	
	Myo-inositolo	50 mg/L	
	Acido Indolacetico (IAA)	0,1 mg/L	
MPF2	Sali MS	4,30 g/L	5.8
	Vitamina Nitsck	1,0 mg/L	
	Saccarosio	20 g/L	
	Plant Agar	2,0 g/L	



## 2.14 Analisi molecolari delle linee transgeniche

L'estrazione del DNA genomico dal tessuto fogliare della cultivar M82 di *S. lycopersicum* è stata effettuata seguendo il protocollo del "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Germany).

Ogni espianto rigenerato è stato verificato per l'inserzione del costrutto RNAi tramite PCR effettuata con la seguente coppia di primer: LeXYL1RNAiFw (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGCAGACGTTGTTCCAATG-3'), ancorato alla sequenza del frammento genico inserito, e KanRev (5'-AGAACTCGTCAAGAAGGCGA-3'), ancorato al gene *nptII* che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina. Il prodotto di reazione è stato visualizzato su gel d'agarosio all'1%.

I trasformanti di M82 positivi per la presenza della cassetta RNAi-*LeXYL1* sono stati sottoposti ad analisi RT-PCR semiquantitativa attraverso il sistema "Superscript<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR" (Invitrogen, CA, USA). L'estrazione dell'RNA totale e la sintesi del cDNA sono stati effettuati come precedentemente descritto. Per l'analisi RT-PCR sono stati utilizzati i primer LeXyl539Fw (5'-TTGCCAAGGGACCTGTAATCC-3') e LeXYL1Rev (5'-CCCCTTCTCCTTGGGGTGTC-3'). Il ciclo è risultato il seguente: 1 ciclo di 5 min a 94°C, 35 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C, e uno step finale di 10 min a 72°C. Come controllo interno, è stata amplificata una regione dell'rRNA 18S utilizzando i primer S1 (5'-TAGATAAAAGGTCGACGCGG-3') e S2 (5'-CCCAAAGTCCAACACTACGAGC-3').

## 2.15 Analisi morfologiche delle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1*

Cinque piante di ogni linea transgenica T<sub>1</sub>-*LeXYL1* e del controllo non trasformato sono state analizzate prendendo in considerazione i seguenti caratteri morfologici: larghezza e lunghezza della foglia, altezza della pianta, numero di internodi e presenza di tricomi.

Le misurazioni dei caratteri sopra indicati sono state effettuate settimanalmente per tre settimane consecutive.

Per l'analisi dei tricomi è stata utilizzata una scala visiva da 1 (pochi tricomi) a 3 (molti tricomi).

## **2.16 Analisi chimiche delle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1***

Le linee transgeniche selezionate per la sottoespressione del gene *LeXYL1* sono state utilizzate per le analisi chimiche relative al contenuto di  $\alpha$ -tomatina. Da ogni individuo transgenico e dal genotipo controllo M82 non trasformato è stato raccolto materiale fogliare che è stato pesato e congelato in azoto liquido. Successivamente, i campioni sono stati liofilizzati e la polvere è stata utilizzata per le analisi chimiche.

### **2.16.1 Estrazione dell' $\alpha$ -tomatina**

Un grammo di tessuto fogliare liofilizzato è stato estratto in 20 ml di una soluzione acquosa all'1% di acido acetico in agitazione per 2 h a temperatura ambiente. Successivamente la soluzione è stata centrifugata a 7000 rpm per 1 h a 10°C; il surnatante è stato filtrato attraverso carta da filtro Whatman N.ro 4. Il residuo è stato riestratto con 10 ml di acido acetico all'1% e i surnatanti sono stati uniti. Gli estratti sono stati, quindi, purificati mediante colonnina preimpaccata C<sub>18</sub> "Solid Phase Extraction" (SPE) con una capacità di 60 ml (Supelco). La colonnina è stata prima condizionata con 5 ml di metanolo seguiti da 5 ml di acqua; successivamente è stato caricato l'estratto acquoso acido (circa 30 ml) precedentemente ottenuto. Infine, si è proceduto al lavaggio utilizzando 10 ml di acqua seguiti da 5 ml di una soluzione acquosa di CH<sub>3</sub>CN/NH<sub>4</sub>OH 1% 3:7 e ulteriori 5 ml di acqua. L'eluizione della tomatina è stata effettuata utilizzando 10 ml di una soluzione di CH<sub>3</sub>CN/HCl 1mM 7:3. L'eluente è stato rimosso mediante distillazione sottovuoto. Il residuo ottenuto è stato sottoposto alle successive analisi.

### **2.16.2 Analisi qualitativa e quantitativa degli estratti**

Gli estratti sono stati risospesi in 1 ml di metanolo ed analizzati mediante cromatografia su TLC di gel di silice (Kieselgel 60 F<sub>245</sub>, 0,25 mm) utilizzando come eluente la miscela EtOAC-MeOH-H<sub>2</sub>O 8,5: 3: 3. I cromatogrammi sono stati visualizzati spruzzando prima H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% in metanolo e poi con acido fosfomolibdico al 5% in etanolo, con successivo riscaldamento in stufa a 110°C per 10 min.

L'analisi quantitativa dell' $\alpha$ -tomatina mediante HPLC è stata eseguita usando una colonna (300 x 7,8 mm, 5 $\mu$ m) Phenomenex POLYSEP-GFC-P 3000 ad esclusione molecolare.

Per l'analisi, 10  $\mu$ l degli estratti fogliari, ottenuti come precedentemente indicato e risospesi in 1 ml di CH<sub>3</sub>CN con poche gocce di acido formico, sono stati iniettati utilizzando un loop di 20

μl. L'eluizione è stata condotta con una miscela costituita da H<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 300 mM /CH<sub>3</sub>CN 9:1 a pH acido con un flusso di 1 ml/min. Il rivelatore UV (Shimadzu) è stato settato a 208 nm.

Per la quantificazione dell'α-tomatina è stata costruita una retta di calibrazione utilizzando concentrazioni note dello standard commerciale (Tomatine, MP Biomedicals). Sono state preparate quattro diluizioni a partire da una soluzione madre allestita sciogliendo 0,5 mg di standard in 1 ml di CH<sub>3</sub>CN con poche gocce di acido formico. Venti μl di ogni diluizione sono stati iniettati in triplicato all'HPLC nelle condizioni precedentemente descritte.

## 2.17 Analisi bioinformatiche

Per le analisi di sequenza è stato utilizzato il software BLAST disponibile nella banca dati dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Gli allineamenti delle sequenze amminoacidiche dedotte sono stati effettuati utilizzando il programma ClustalW (Thompson *et al.* 1994) sulla base dei parametri standard. La traduzione delle "open reading frame" (ORF), la determinazione del punto isoelettrico e del peso molecolare delle proteine predette sono state effettuate, rispettivamente, tramite i software Translate a DNA sequence (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/>) e Compute pI/Mwsoftware ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). L'analisi filogenetica è stata condotta mediante l'utilizzo del software CLC Sequence Viewer 6.2. Il software Alternative Splice Site Predictor (ASSP) (<http://www.es.embnnet.org/~mwang/assp.html>) è stato utilizzato per la predizione dei siti di splicing del gene *CAS1*. Il programma bioinformatico Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey>) è stato impiegato per determinare l'organizzazione genomica del gene *SMT1*, oltre che per definirne la fase intronica (che specifica la posizione di un determinato introne): "0" indica che l'introne è collocato tra due codoni, mentre gli introni in fase "1" e "2" si trovano, rispettivamente, dopo il primo e il secondo nucleotide di un codone. I domini transmembrana e il grado di idrofobicità delle proteine sequenziate sono stati analizzati utilizzando, rispettivamente, i software HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>) e SOSUI ([http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)). L'impiego del database Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e del software Conserved Domains and Protein Classification (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) hanno consentito l'identificazione dei domini conservati delle proteine.

## **2.18 Analisi statistiche**

I dati morfometrici e quelli relativi alle analisi chimiche delle linee T<sub>1</sub>-*LeXYLI* sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il test di Dunnet ( $p \leq 0,05$ ) con l'ausilio del software JMP ver. 6.0 (SAS Institute 2006).

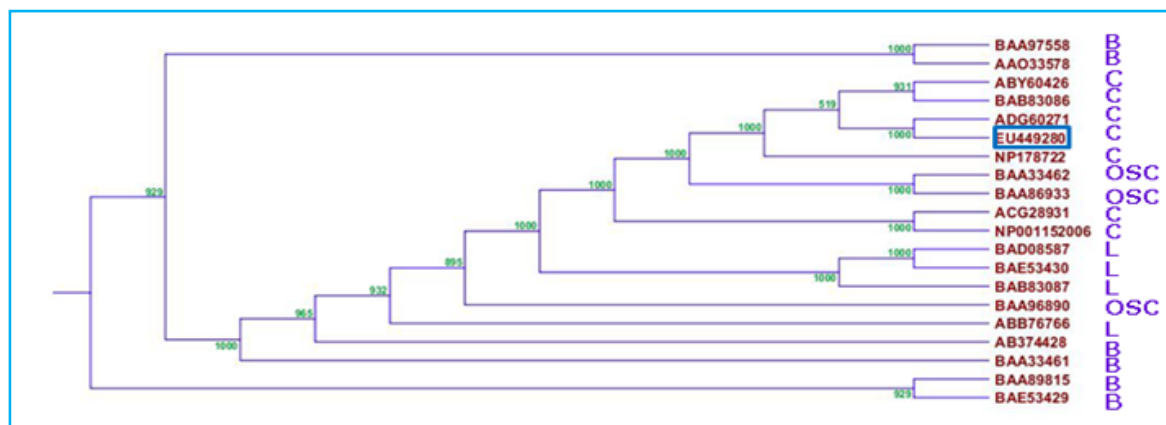
### 3. RISULTATI

#### 3.1 Studio di geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina

##### 3.1.1 Isolamento e clonaggio del gene della cicloartenolo sintasi (CAS1)

Per l'isolamento del gene *CAS1* è stato utilizzato un prodotto di amplificazione di 660 bp ottenuto mediante PCR Nested utilizzando la coppia di primer degenerati 711A e 161S. L'analisi BLAST della parziale sequenza amminoacidica dedotta di *CAS1* ha confermato l'omologia con altre cicloartenolo sintasi; in particolare, il più alto valore di identità, pari all'80%, è stato riscontrato con le cicloartenolo sintasi di *Olea europea* e *Centella asiatica*.

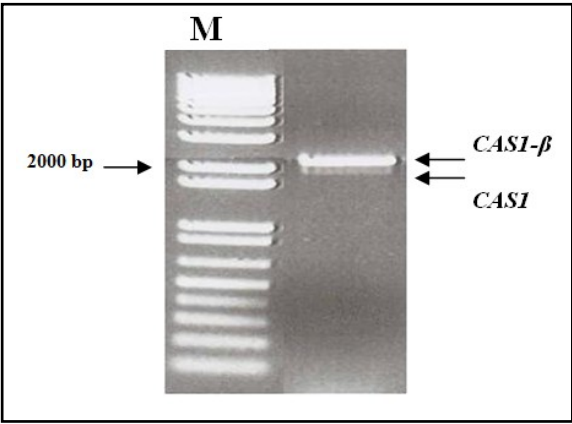
Attraverso le 3' e 5' RACE-PCR condotte, rispettivamente, con l'impiego dei primer specifici CAS3 e CAS5 è stata ottenuta la sequenza completa del gene *CAS1* di pomodoro. L'ORF codifica per una proteina di 757 amminoacidi con un punto isoelettrico teorico di 6,26 e un peso molecolare di 85,78 KDa. L'analisi filogenetica, eseguita con il metodo "Neighbor-joining", ha mostrato una stretta relazione tra *CAS1* e le altre cicloartenolo sintasi di pianta e, in particolare, con quella di *Withania somnifera* (Figura 6).



**Figura 6** - Dendrogramma relativo all'analisi filogenetica del gene *CAS1* costruito con il metodo "Neighbor-joining"; i numeri sui nodi indicano i bootstrap (1000 replicati). Le funzioni catalitiche sono indicate dalle lettere maiuscole: B=  $\beta$ -amirina sintasi, C= cicloartenolo sintasi, L= lupeolo sintasi, OSC= ossidosqualene ciclasi. EU449280= cicloartenolo sintasi di *S. lycopersicum*, ADG60271= cicloartenolo sintasi di *W. somnifera*.

L'analisi della sequenza proteica di CAS1 tramite l'utilizzo del database HMMTOP ha suggerito un modello topologico caratterizzato dalla presenza di due domini transmembrana di cui il primo in corrispondenza dei residui amminoacidici in posizione 161-180 (MFLMPGMIIALSITGALNAV) ed il secondo nella regione di sequenza tra gli amminoacidi in posizione 250-267 (TAITSWGKMWLSVLGVF). La sequenza nucleotidica di *CAS1* è stata sottomessa nella banca dati della NCBI (acc. number EU449280).

Oltre al prodotto di amplificazione di 2274 bp, i primer CAS3 e CAS5 hanno evidenziato anche la presenza di un secondo amplicone, identificato come *CAS1-β*, con un più alto peso molecolare (Figura 7).



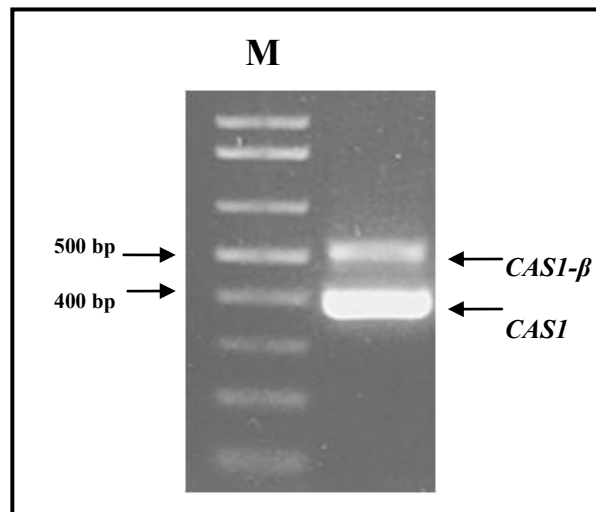
**Figura 7** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR relativa al gene *CAS1* su cDNA di foglia di *S. lycopersicum*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

I due prodotti PCR sono stati clonati e sequenziati: dall'allineamento delle due sequenze si è evidenziato che *CAS1* rispetto a *CAS1-β* mostrava un “gap” di 106 bp (Figura 8).

CAS1	AGCACATTCATTCTTAACAAATACACAAGT-----	1349
CAS1-beta	AGCACATTCATTCTTAACAAATACACAAGTATAATATTGCTGGGTCATATTATTATGGT	1380
	*****	
CAS1	-----	
CAS1-beta	GTAATCTTCCATATTATCTTGATTTTACCTGATATTGATATAATTGCAAGAACATT	1440
CAS1	-----GTTAGATAATTGCCCTGGTGATCTAGATTCTGGTATCGTCATA	1393
CAS1-beta	TCTTTACTTTGAAGGTGTTAGATAATTGCCCTGGTGATCTAGATTCTGGTATCGTCATA	1500
	*****	

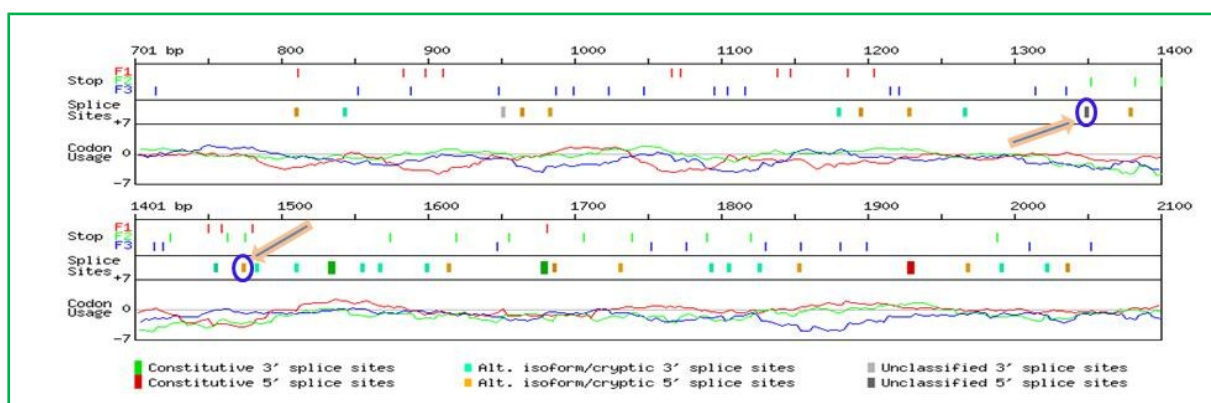
**Figura 8** - Allineamento delle sequenze nucleotidiche parziali di *CAS1* e *CAS1-β* realizzato con il software ClustalW.

Sulla regione fiancheggiante il "gap" sono stati disegnati i primer CASintF e CASintR per allestire una reazione PCR che ha identificato due ampliconi con una differenza in peso molecolare di circa 100 bp (Figura 9).



**Figura 9** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR relativa alle due isoforme del gene *CASI* su cDNA di foglia di *S. lycopersicum*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

L'analisi computazionale del trascritto *CASI-β* realizzata con il programma Alternative Splice Site Predictor (ASSP) ha mostrato due possibili siti di splicing in posizione 1349 bp e 1455 bp (Figura 10). La presenza della sequenza aggiuntiva di 106 bp in *CASI-β* determinava la formazione di un codone di stop anticipato (Figura 11).



**Figura 10** - Analisi del trascritto *CASI-β* con il programma Alternative Splice Site Predictor (ASSP) (<http://www.es.embnet.org/~mwang/assp.html>); le frecce indicano due putativi siti di splicing alternativo in posizione 1349 bp e 1455 bp.

CAS1	RYICIGFVNKIINMLCCWVEDPNSEAFKLHLPRIHDYMWVAEDGMKMGYNQSCWDTSF
CAS1-beta	RYICIGFVNKIINMLCCWVEDPNSEAFKLHLPRIHDYMWVAEDGMKMGYNQSCWDTSF
	*****
CAS1	AVQAIATGFGEYGSTLRKAHSFLTNTQVLDNCPGDLDWFYRHISKGAWPFSTADHGWP
CAS1-beta	AVQAIATGFGEYGSTLRKAHSFLTNTQVSTOP-----
	*****

**Figura 11** - Parziali sequenze amminoacidiche dedotte dei geni *CAS1* e *CAS1-β*; nella box è evidenziato il codone di stop anticipato presente nella sequenza di *CAS1-β*.

### 3.1.2 Isolamento e clonaggio del gene della sterol-metiltransferasi 1 (*SMT1*)

Dal confronto delle sequenze delle sterol-metiltransferasi disponibili in banca dati sono state evidenziate le regioni amminoacidiche conservate di questi enzimi. Sulla base delle sequenze GWGESFHF e PWYLPLD è stata disegnata la prima coppia di primer degenerati SMT1F e SMT1R, mentre sulle sequenze VLDVGCGI e FDAVYAIE è stata disegnata la seconda coppia di primer degenerati SMT2F e SMT2R (Figura 12).

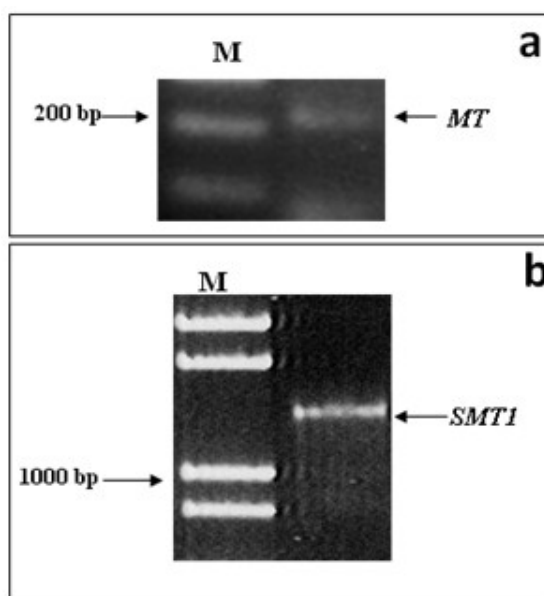




AAC34951	SQRVQAFLEKAAEGLVGGAKKGIFTMPYFFVVRKPI	SDSQ
AAZ83345	SQRVQDFLEKAAEGLVEGGRKEIFTMPYFFLARKPL	SESQ
AAC04265	SERVSSFLEKAAEGLVEGGKKEIFTMPYFFFVRKPL	LE--
NP196875	SQRVSNFLEQAAEGLVDGGRREIFTMPYFFLARKPE	----
Cons	*:*:* . ***:***** *: : ***** . .***	

**Figura 12** - Allineamento delle sequenze amminoacidiche dedotte di alcune sterol-metiltransferasi disponibili in banca dati: AAC34951, S-adenosil metionina sterol-C- metiltransferasi di *Nicotiana tabacum*; AAZ83345, 24-sterol C-metiltransferasi di *Gossypium hirsutum*; AAC04265, (S)-adenosil-L-metionina:delta 24-sterol metiltransferasi di *Zea mays*; NP196875, cicloartenol-C-24-metiltransferasi di *Arabidopsis thaliana*. Le frecce indicano le regioni conservate su cui sono state disegnate le coppie di primer degenerati.

Utilizzando queste coppie di primer degenerati ed applicando la strategia della Nested PCR è stato ottenuto un amplicone di 200 bp (*MT*) (Figura 13a) la cui sequenza ha mostrato un elevato livello di omologia con il clone U574339 disponibile nella banca dati SGN (<http://solgenomics.net/>). Sulla sequenza di tale clone sono stati disegnati i primer specifici SMT7 e SMT8 che hanno consentito di ottenere l'intero "full-length" del gene costituito da 1038 bp (Figura 13b) e codificante per una proteina di 346 amminoacidi con un punto isoelettrico teorico di 5,10 e un peso molecolare di 84,18 KDa.



**Figura 13** - Analisi elettroforetiche su gel di agarosio delle reazioni di PCR relative al frammento di *SMT1* (*MT*) (a) e al suo "full-length" (b) su cDNA di foglia di *S. lycopersicum*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

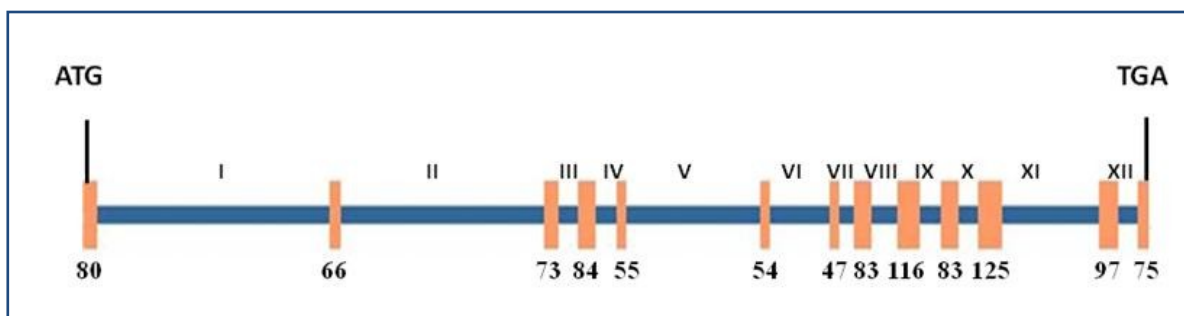
L'analisi comparativa, effettuata in GenBank utilizzando il programma BLAST, ha confermato l'omologia tra la sequenza del gene *SMT1* di pomodoro e quella di altre sterol-metiltransferasi; in particolare, un elevato livello di identità è stato riscontrato con la S-adenosil-metionina-sterol-C-metiltransferasi di *Nicotiana tabacum* (94%) (Tabella 5).

**Tabella 5** – Percentuali di identità tra la sequenza amminoacidica dedotta del gene della sterol metiltransferasi (*SMT1*) isolato in *S. lycopersicum* ed altre SMT disponibili in banca dati.

Proteina	Specie	Identità	E-value
Sterol-metiltransferasi	<i>Nicotiana tabacum</i>	94%	0.0
Sterol-metiltransferasi	<i>Zea mays</i>	81%	0.0
Sterol-metiltransferasi	<i>Glycine max</i>	78%	0.0
Sterol-metiltransferasi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51%	3e-103

Un'ulteriore caratterizzazione *in silico* di SMT1 ha evidenziato la presenza di quattro regioni di cui la regione I (da Y81 a F91), la regione III (da Y192 a H199) e la IV (da K215 a W235), che sono tipici siti di interazione con gli steroli, e la regione II (da L124 a F133) che è il caratteristico dominio "AdoMet". Inoltre, l'analisi topologica di SMT1 ha evidenziato l'assenza di domini transmembrana e del dominio idrofobico di circa 25 amminoacidi nella regione N-terminale della proteina.

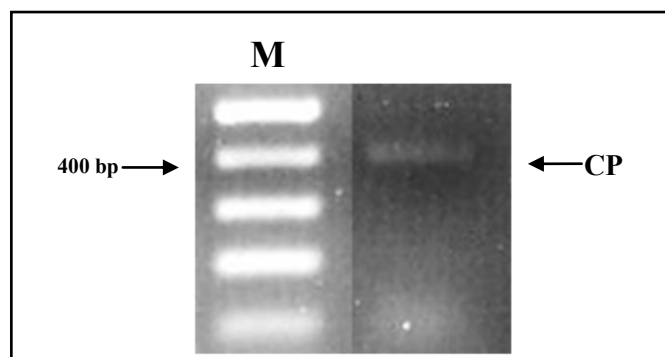
Per l'isolamento della sequenza genomica di *SMT1*, sono stati disegnati primer specifici sulla regione 5' UTR e sulla regione 3' della ORF comprendente il codone di stop. Il prodotto PCR amplificato di 5629 bp è stato clonato e sequenziato mediante approccio "walking primer". L'organizzazione introne/esone di *SMT1* è stata determinata comparando le sequenze del DNA genomico e del cDNA (Figura 14). I 13 esoni totali, con una lunghezza media di 79,8 bp, coprono una regione genomica di *SMT1* pari a 1038 bp. Gli introni, con una lunghezza compresa tra 70 bp (introne VII) e 1147 bp (introne I) coprono, invece, l'80,6% della regione genomica di *SMT1*. Per quanto concerne la localizzazione degli introni, otto risultano in fase "0" e quattro in fase "2".



**Figura 14** - Schema relativo all'organizzazione genomica di *SMT1* ottenuto con il software Spidey ([www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/)). I numeri romani rappresentano i 12 introni, mentre in arancione sono indicati i 13 esoni con le rispettive lunghezze in bp riportate in basso.

### 3.1.3 Isolamento e clonaggio del gene della obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi (*CYP51*)

Il gene *CYP51* è stato clonato con approccio Nested PCR, così come precedentemente descritto. Un primo frammento di 400 bp (CP) è stato ottenuto utilizzando la coppia di primer CYP1F e CYP1R e successivamente la coppia di primer CYP2F e CYP2R (Figura 15).

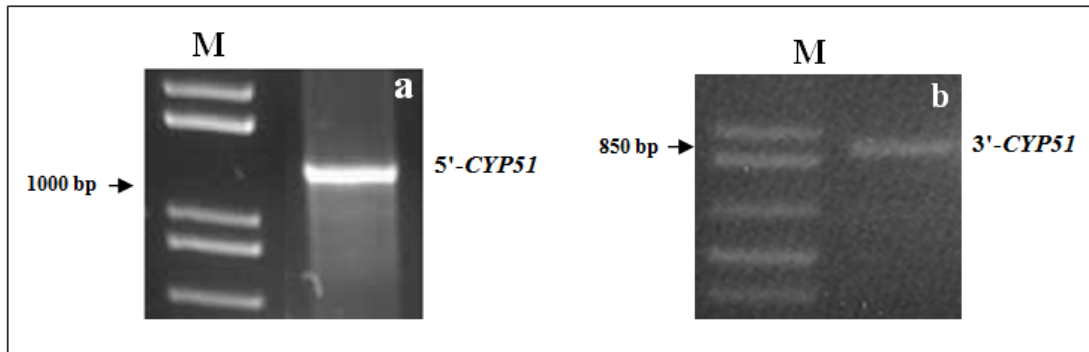


**Figura 15** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio del frammento CP del gene *CYP51*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

L'analisi BLAST ha evidenziato un'identità dell'88% tra la parziale sequenza amminoacidica dedotta di *CYP51* e l'obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi di *Solanum chacoense*.

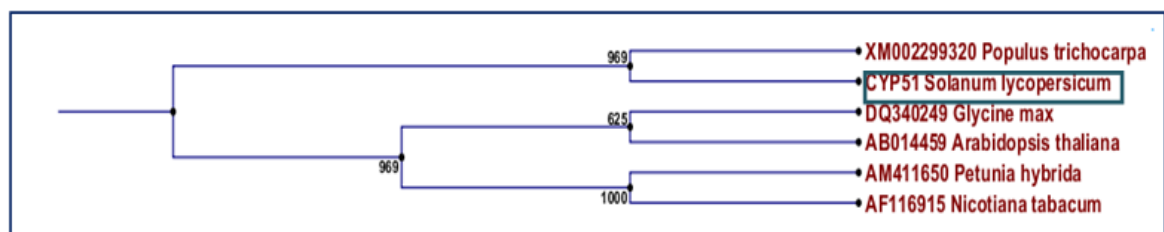
Attraverso le reazioni 5' e 3' RACE-PCR sono stati ottenuti, rispettivamente, ampliconi di 1000 bp e 850 bp (Figura 16a,b). Utilizzando i primer CYP3 e CYP5 è stato ottenuto il cDNA "full-length" che è risultato di 1464 bp e codificante per una proteina di 487 amminoacidi con un punto

isoelettrico teorico di 8,41 e un peso molecolare di 55,26 KDa. La sequenza nucleotidica di *CYP51* è stata sottomessa nella banca dati della NCBI (acc. number HM237354).



**Figura 16** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni 5' (a) e 3' RACE (b) del gene *CYP51*.  
Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

L'analisi filogenetica, eseguita con il metodo "Neighbor-joining", ha evidenziato una stretta relazione tra *CYP51* e le altre obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi di pianta (Figura 17).

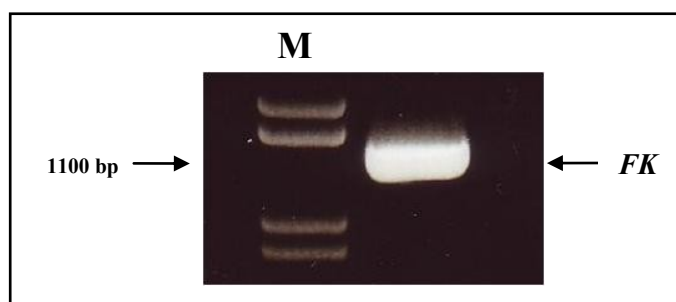


**Figura 17** - Dendrogramma relativo all'analisi filogenetica del gene *CYP51* costruito con il metodo "Neighbor-joining"; i numeri sui nodi indicano i bootstrap (1000 replicati).

L'analisi della sequenza proteica di CYP51 tramite l'utilizzo del database Pfam ha mostrato la presenza di un dominio conservato comune alla famiglia delle citocromo P450, dominio riscontrato anche nelle altre obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi di pianta già caratterizzate. Inoltre, la sequenza amminoacidica dedotta di CYP51, presenta anche una regione conservata deputata all'interazione con gruppi "heme" (da Y420 a Q439) e di un sito di riconoscimento del substrato (da Q103 a D121). L'analisi topologica della proteina ha indicato la presenza di due domini transmembrana.

### 3.1.4 Isolamento e clonaggio del gene della sterol C-14 reduttasi (FK)

Per il clonaggio di *FK* si è partiti dalla sequenza del gene della sterol C-14 reduttasi di *Arabidopsis thaliana* (acc. number BT000546) che, blastata nel database dell'SGN, ha consentito di identificare il clone SGN-E245579 di *S. lycopersicum*. Sono stati, quindi, disegnati i primer FK3 e FK5 per la messa a punto delle reazioni RACE-PCR che hanno consentito di estendere la sequenza in direzione 3' e 5' producendo ampliconi, rispettivamente, di 890 e 377 bp. Infine, con l'impiego dei primer specifici FKFL5 e FKFL3, è stato possibile ottenere il "full-length" di *FK*, una ORF di 1110 bp (acc. number HM991858) (Figura 18) codificante per una proteina di 369 amminoacidi con un punto isoelettrico teorico di 9,11 e un peso molecolare di 41,78 KDa.



**Figura 18** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR relativa al gene *FK* su cDNA di foglia di *S. lycopersicum*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

La sequenza amminoacidica dedotta di *FK* ha mostrato un'elevata similarità con le sterol C-14 reduttasi di altre specie; in particolare sono stati riscontrati elevati valori di identità con gli enzimi di *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana* e *Triticum aestivum* (Tabella 6).

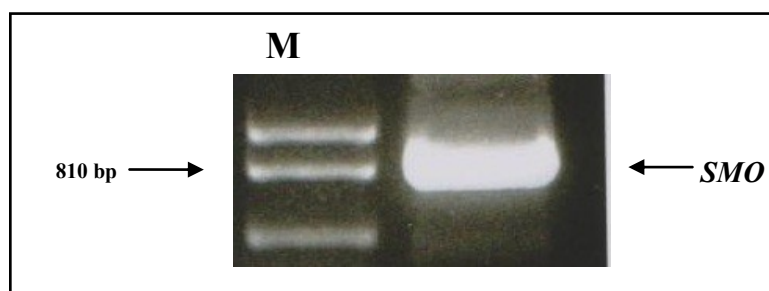
**Tabella 6** – Percentuali di identità tra la sequenza amminoacidica dedotta del gene della sterolo C-14 riduttasi (*FK*) isolato in *S. lycopersicum* ed altre FK disponibili in banca dati.

Proteina	Specie	Identità	E-value
Sterolo C-14 riduttasi	<i>Vitis vinifera</i>	81%	0.0
Sterolo C-14 riduttasi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77%	0.0
Sterolo C-14 riduttasi	<i>Triticum aestivum</i>	73%	0.0

La putativa composizione amminoacidica è risultata ricca in leucina (17,1%) e fortemente idrofobica, con una topologia di nove domini transmembrana. Il gene *FK* ha mostrato anche un'elevata omologia con il recettore laminare tipico dei vertebrati (LBR) ed è caratterizzato da una sequenza segnale (LLXSGYWGX<sub>2</sub>RH) e dai domini ERG4/ERG24 e ICMT (isoprenil cisteina carbossil metiltransferasi).

### 3.1.5 Isolamento e clonaggio del gene della sterol-4 $\alpha$ -metilossidasi (*SMO*)

Un primo frammento di 438 bp del gene *SMO* è stato ottenuto partendo dall'EST di pomodoro (EST416063) reperita in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Utilizzando questa sequenza è stato disegnato il primer SMOF per realizzare la PCR 3'-RACE che ha fornito un amplicone di 677 bp. L'ORF completa del gene è risultata di 810 bp (Figura 19), codificante per una proteina di 269 amminoacidi con un peso molecolare di 31,36 kDa e un punto isoelettrico teorico di 7,74. La sequenza nucleotidica del cDNA "full-length" è stata depositata nella banca dati della NCBI (acc. number JF732929).



**Figura 19** - Analisi elettroforetica su gel di agarosio della reazione di PCR relativa al gene *SMO* su cDNA di foglia di *S. lycopersicum*. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari.

L'analisi comparativa, effettuata utilizzando gli algoritmi BLAST (BLASTX e BLASTP), ha evidenziato la relazione di omologia tra la SMO di pomodoro e le altre sterolo metilossidasi di pianta già annotate e reperibili in banca dati; in particolare, un elevato grado di omologia è stato osservato con la sterol-4 $\alpha$ -metilossidasi 2 di *Arabidopsis thaliana* (87%) e la C-4 sterol-metilossidasi di *Ricinus communis* (86%) (Tabella 7). La proteina SMO, analizzata con il software HMMTOP, ha mostrato la presenza di cinque domini transmembrana.

**Tabella 7** – Percentuali di identità tra la sequenza amminoacidica dedotta del gene della sterol metilossidasi (SMO) isolato in *S. lycopersicum* ed altre SMO disponibili in banca dati.

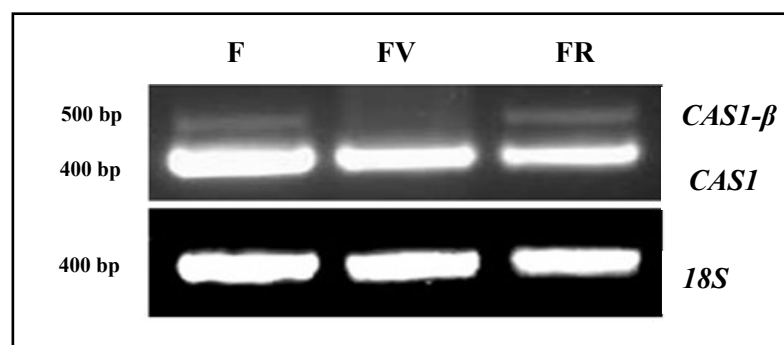
Proteina	Specie	Identità	E-value
Sterol-metilossidasi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	87%	0.0
Sterol-metilossidasi	<i>Ricinus communis</i>	86%	2e-180
Sterol-metilossidasi	<i>Gossypium arboreum</i>	85%	2e-178

### 3.1.6 Analisi di espressione dei geni coinvolti nell'anabolismo

#### 3.1.6.1 Studio di espressione delle due isoforme del gene CASI

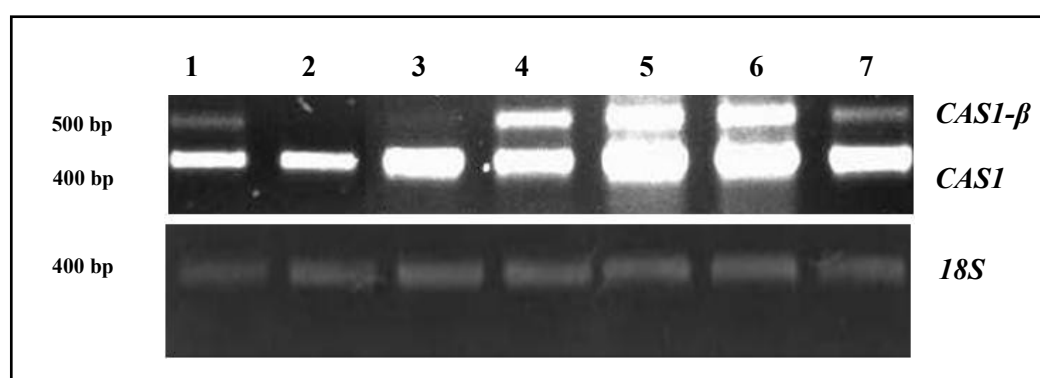
Per lo studio d'espressione delle isoforme del gene *CASI* è stata condotta un'analisi RT-PCR utilizzando cDNA di foglia, frutto verde e frutto rosso di *S. lycopersicum* con l'impiego dei primer CASintF e CASintR. L'analisi ha evidenziato un'espressione tessuto specifica di entrambe le isoforme del gene; in particolare esse hanno mostrato profili di espressione simili in foglia e frutto rosso, dove si ha un significativo accumulo di trascritto di *CASI* e una più bassa espressione di *CASI- $\beta$* ; in frutto verde, invece, è risultata espressa solo l'isoforma di *CASI*, con una bassissima, se non addirittura nulla, espressione di *CASI- $\beta$*  (Figura 20).





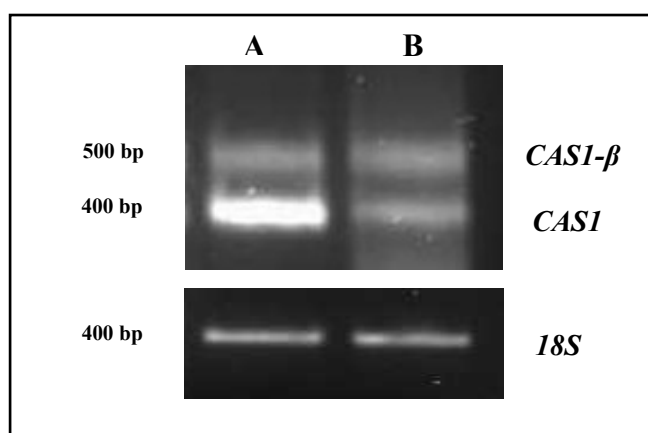
**Figura 20** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa alle isoforme del gene *CASI* in foglia (F), frutto verde (FV) e frutto rosso (FR) di *S. lycopersicum*. L'amplificazione del 18S è stata utilizzata come controllo interno.

I profili di espressione delle due isoforme di *CASI* sono stati analizzati anche in diverse specie selvatiche di pomodoro e nella cultivar SM di *S. lycopersicum*. *CASI* e *CASI-β* hanno mostrato livelli di espressione particolarmente elevati in *S. neorickii* (LA2133) e *S. habrochaites* (LA1777); l'espressione di *CASI-β* è risultata quasi nulla in *S. lycopersicoides* (LA2951) e del tutto assente in *S. pimpinellifolium* (LA1589) (Figura 21).



**Figura 21** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa alle isoforme del gene *CASI* in diverse specie di pomodoro: 1: *S. pennellii* LA0716; 2: *S. pimpinellifolium* LA1589; 3: *S. lycopersicoides* LA2951; 4: *S. chmielewskii* LA1327; 5: *S. neorickii* LA2133; 6: *S. habrochaites* LA1777; 7: *S. lycopersicum* cv. SM.

Allo scopo di verificare un possibile coinvolgimento nei meccanismi di risposta alla luce delle isoforme di *CAS1*, ne è stata condotta l'analisi di espressione su piante di *S. lycopersicum* cv. SM allevate in condizioni di fotoperiodo naturale (16 h luce/8 h buio) e in condizioni di buio continuo. L'analisi RT-PCR semiquantitativa ha evidenziato che l'espressione di *CAS1* è più elevata nelle piante cresciute in condizioni di fotoperiodo naturale, mentre risulta ridotta nelle piante allevate in condizioni di buio continuo; per contro, i livelli di espressione di *CAS1-β* sono risultati più elevati nelle piante allevate al buio (Figura 22).

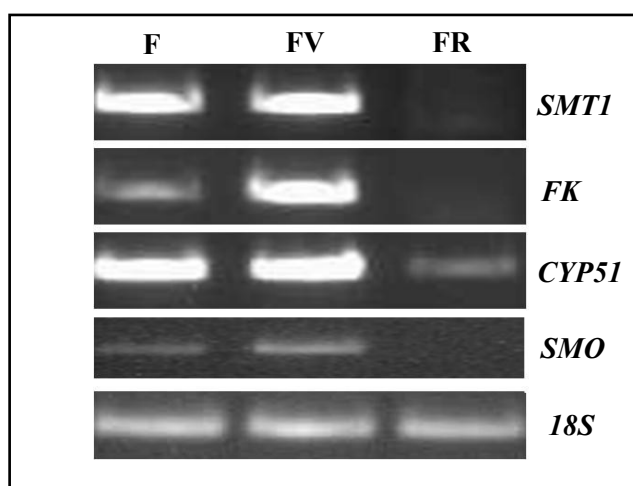


**Figura 22** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa alle isoforme del gene *CAS1* in tessuto fogliare di piante di *S. lycopersicum* allevate in condizioni di fotoperiodo naturale (A) e di buio continuo (B). L'amplificazione del 18S è stata utilizzata come controllo interno.

### 3.1.6.2 Analisi trascrizionale dei geni *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO*

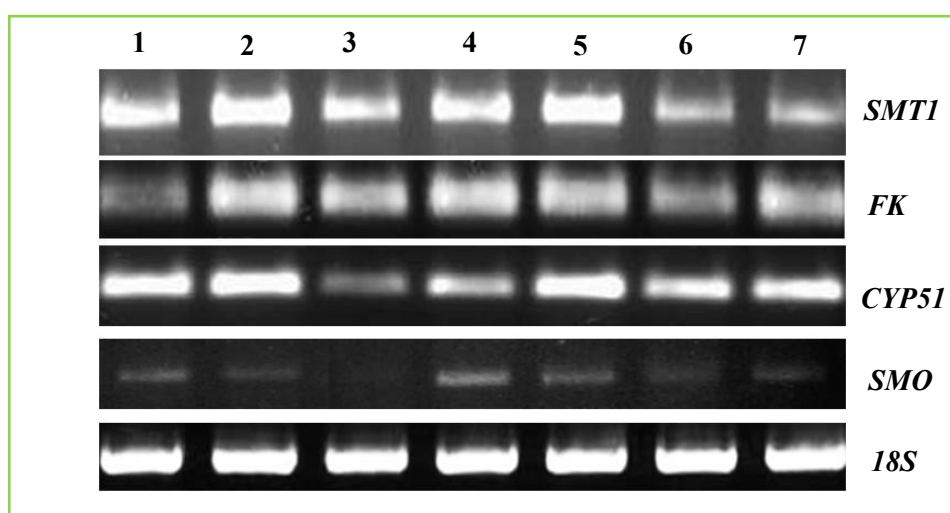
Lo studio di espressione dei geni coinvolti nell'anabolismo dell' $\alpha$ -tomatina è stato effettuato attraverso RT-PCR semiquantitativa su diversi organi e specie di pomodoro.

I livelli di trascritto in foglia sono risultati elevati per *SMT1* e *CYP51* e più ridotti, invece, per *FK* e *SMO*. In frutto verde si sono osservati alti livelli di espressione di *SMT1*, *CYP51* e *FK*, mentre *SMO* è risultato debolmente espresso. In frutto rosso, infine, si è avuto un ridotto accumulo di trascritto solo per il gene *CYP51*, mentre gli altri trascritti sono risultati assenti o solo debolmente espressi (Figura 23).



**Figura 23** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa ai geni *SMT1*, *FK*, *CYP51* e *SMO* in foglia (F), frutto verde (FV) e frutto rosso (FR) di *S. lycopersicum*.

L'analisi di espressione dei geni coinvolti nell'anabolismo dell' $\alpha$ -tomatina è stata condotta anche in diverse specie di pomodoro, evidenziando pattern di espressione specie-specifici. In particolare *SMT1*, *CYP51*, e *FK* hanno mostrato alti livelli di espressione in *S. neorickii* (acc. LA2133), *S. habrochaites* (acc. LA1777) e *S. pimpinellifolium* (acc. LA1589). I livelli di espressione di *SMO* sono risultati generalmente bassi e nella specie *S. chmielewskii* (acc. LA1327) esso è sembrato non essere espresso (Figura 24)



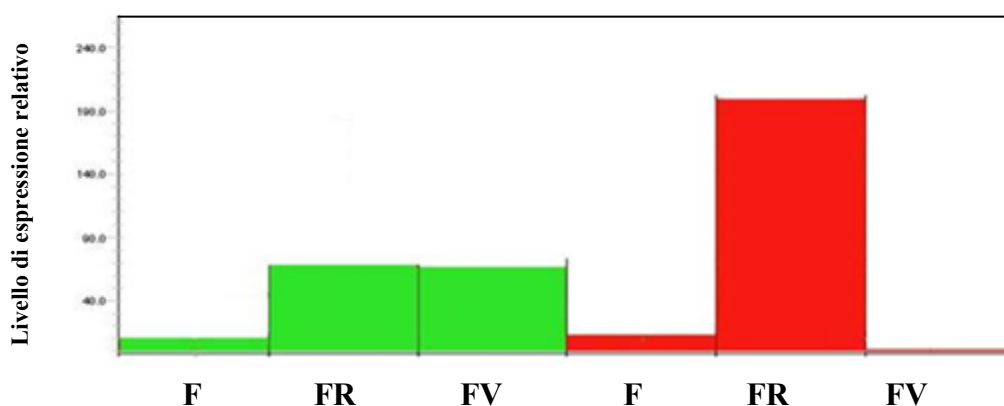
**Figura 24** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa ai geni *SMT1*, *FK*, *CYP51* e *SMO* in diverse specie di pomodoro. 1: *S. lycopersicum* cv. SM; 2: *S. neorickii* acc. LA2133; 3: *S. chmielewskii* acc. LA1327; 4: *S. habrochaites* acc. LA1777; 5: *S. pimpinellifolium*; LA1589; 6: *S. lycopersicoides* acc. LA2951; 7: *S. pennellii* acc. LA0716.

## 3.2 Studio del pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina

### 3.2.1 Identificazione e studio di espressione del gene *LeXYL1*

Per l'identificazione di un putativo gene coinvolto nel pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina, è stata utilizzata la sequenza della tomatinasi di *S. lycopersici* (acc. number U24701). L'analisi BLAST di questa sequenza sul genoma di *S. lycopersicum* ha consentito di identificare due geni di pomodoro, *LeXYL1* e *LeXYL2*, entrambi codificanti per delle  $\beta$ -D-xilosidasi, che hanno mostrato, rispettivamente, il 24% e il 23% di identità con la tomatinasi fungina.

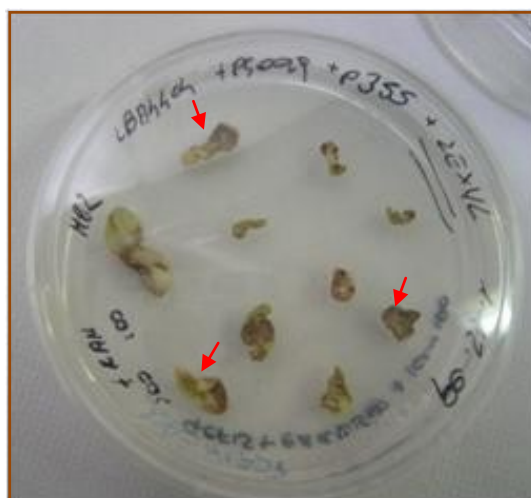
Allo scopo di studiare l'espressione di *LeXYL1*, è stata realizzata una Real Time PCR su cDNA di foglia, frutto verde e frutto rosso di *S. lycopersicum* cv. SM e della variante andina *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LA2213). L'analisi ha mostrato che nella cv. *cerasiforme* il livello di espressione di *LeXYL1* risulta simile in frutto rosso e frutto verde, mentre nella cv. SM si ha un'elevata espressione del gene in frutto rosso e una ridotta espressione in frutto verde (Figura 25).



**Figura 25** - Profili di espressione relativa di *LeXYL1* in *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LA2213) (in verde) e *S. lycopersicum* cv. SM (in rosso), ottenuti mediante Real Time PCR. Legenda: F, foglia; FR, frutto rosso; FV frutto verde.

### 3.2.2 Analisi funzionale del gene *LeXYL1*: strategia dell'overespressione

Per verificare il ruolo di *LeXYL1* nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina è stato effettuato lo studio funzionale del gene adottando la strategia dell'overespressione. A tale scopo, il gene *LeXYL1*, posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S, è stato clonato in cellule elettrocompetenti LBA4404 di *A. tumefaciens* e trasferito mediante co-cultura in espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum*. Ripetuti esperimenti di trasformazione, tuttavia, non hanno consentito di ottenere rigeneranti trasformati poiché gli espianti, dopo circa tre settimane dalla co-cultura, diventavano albini e successivamente necrotizzavano (Figura 26).



**Figura 26** - Espianti necrotizzati della cultivar M82 di *S. lycopersicum* in seguito a co-cultura con il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* contenente il costrutto pG35S::*LeXYL1*.

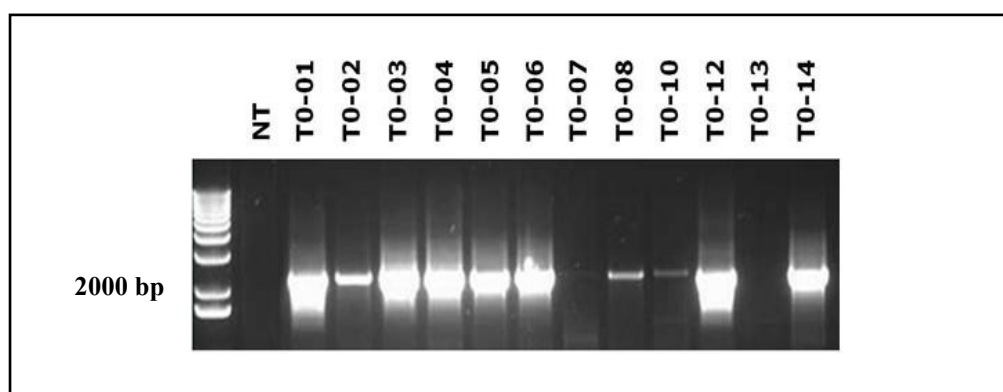
### 3.2.3 Analisi funzionale del gene *LeXYL1*: strategia del silenziamento

Per lo studio funzionale del gene *LeXYL1* è stato anche applicato un approccio "RNA interference" per il silenziamento del gene. Dall'esperimento di co-cultura degli espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum* con il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* recante il vettore "hairpinRNAi" (pHG-*LeXYL1*), sono stati ottenuti 18 germogli, con una frequenza di trasformazione di circa il 20% nel corso di tre settimane dalla co-cultura. Di questi germogli posti sul substrato di radicazione contenente kanamicina, 14 hanno prodotto radici (Figura 27).



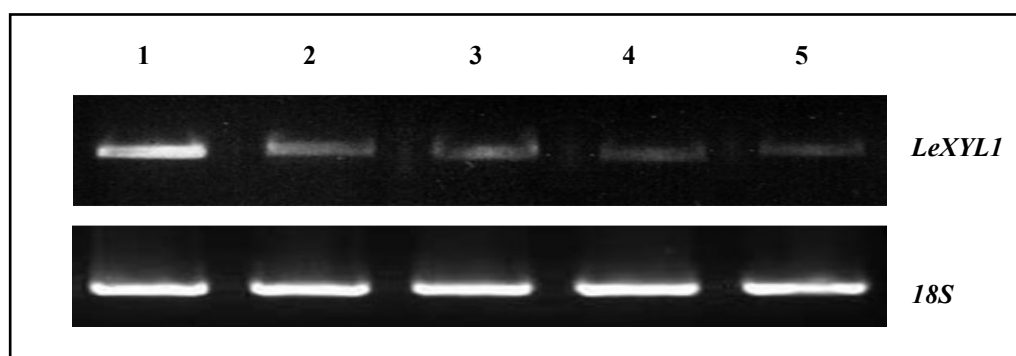
**Figura 27** - Germogli radicati su mezzo selettivo ottenuti da espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum* trasformati con il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* recante il vettore "hairpinRNAi" (pHG-*LeXYL1*).

Da ciascun espianto rigenerato, putativamente trasformato, è stato prelevato del materiale fogliare per le analisi molecolari. I primer impiegati, LeXYL1RNAiFw e KanRev, hanno amplificato una parte del gene *LeXYL1* inserito nella cassetta RNAi e una regione del gene di resistenza all'antibiotico kanamicina, producendo un amplicone di circa 2000 bp. Undici (T<sub>0</sub>-*LeXYL1*) delle linee analizzate sono risultate positive alla trasformazione (Figura 28) e sono state portate a seme per l'ottenimento della generazione successiva.



**Figura 28** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione PCR relativa al gene *LeXYL1* su DNA genomico estratto da piante di *S. lycopersicum* cv. M82 trasformata con il vettore pHG-*LeXYL1* e radicate su mezzo selettivo. Legenda: M, marcatore di pesi molecolari; NT: controllo non trasformato.

L'analisi molecolare mediante RT-PCR ha consentito di selezionare le piante T<sub>1</sub>-8-1, T<sub>1</sub>-10-1, T<sub>1</sub>-10-3 e T<sub>1</sub>-10-4 che mostravano una sottoespressione del gene *LeXYL1* (Figura 29).



**Figura 29** - Analisi elettroforetica su gel d'agarosio della reazione RT-PCR semiquantitativa relativa al gene *LeXYL1*. Legenda: 1, controllo non trasformato; 2, T<sub>1</sub>-8-1-*LeXYL1*; 3, T<sub>1</sub>-10-1-*LeXYL1*; 4, T<sub>1</sub>-10-3-*LeXYL1*; 5, T<sub>1</sub>-10-4-*LeXYL1*.

Su queste piante è stata condotta l'analisi dei caratteri morfologici; come è possibile verificare in Tabella 8, per quel che concerne la lunghezza e la larghezza delle foglie e la densità di tricomi non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i transgeni ed il controllo, fatta eccezione per la linea T<sub>1</sub>-10-4 che ha presentato un minor numero di tricomi. Inoltre, per quanto riguarda i valori riferiti all'altezza della pianta e al numero di internodi, la pianta T<sub>1</sub>-10-3 ha mostrato valori significativamente differenti rispetto al controllo per questi caratteri.

**Tabella 8** - Valori medi e deviazioni standard relativi a lunghezza e larghezza foglie, altezza piante, numero di internodi e densità dei tricomi delle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1* e del controllo non trasformato della cv. M82 di *S. lycopersicum*. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi al test di Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

Genotipo	Larghezza foglia (cm)	Lunghezza foglia (cm)	Altezza pianta (cm)	Internodi (n°)	Tricomi
M82 (ctr)	3,33 ± 0,38a	7,3 ± 0,62a	32,46 ± 10,46a	8,33 ± 2,88ab	3,00 ± 0,00a
T1-8-1	1,83 ± 0,90a	4,06 ± 2,24a	23,00 ± 12,57a	9,00 ± 2,64a	2,66 ± 0,58a
T1-10-1	2,30 ± 0,95a	4,86 ± 2,22a	22,16 ± 12,08a	8,00 ± 2,00ab	2,66 ± 0,58a
T1-10-3	1,98 ± 0,94a	3,76 ± 2,54a	10,30 ± 5,87b	5,00 ± 2,00b	3,00 ± 0,00a
T1-10-4	2,63 ± 1,20a	4,53 ± 1,85a	25,96 ± 5,65ab	9,66 ± 0,58a	1,66 ± 0,58b

E' stato anche condotto lo studio funzionale del gene *LeXYL1* sotto il controllo di due promotori frutto specifici, quelli dei geni della fosfoenolpiruvato carbossilasi 2 (PPC2) e della poligalatturonasi (PG). Dall'esperimento di co-cultura degli espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum* con il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* recante il vettore "hairpinRNAi" pDEST-PPC2-*LeXYL1* sono stati ottenuti 15 germogli, con una frequenza di trasformazione di circa 20%, in tre settimane dalla co-cultura. Analogamente, dall'esperimento di co-cultura degli espianti cotiledonari della cultivar M82 di *S. lycopersicum* con il ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* recante il vettore "hairpinRNAi" pDEST-PG-*LeXYL1*, sono stati ottenuti 16 germogli, con una frequenza di trasformazione di circa 20%, in tre settimane dalla co-cultura.

L'analisi molecolare dei germogli radicati su mezzo selettivo è in corso.

### 3.2.4 Analisi chimiche del materiale transgenico

Le quantità di foglia liofilizzata (peso secco) e di estratto organico ottenuti da ciascuna linea transgenica e dal controllo non trasformato sono riportate in Tabella 9. Per ciascuna linea T<sub>1</sub>-*LeXYL1* e per il controllo non trasformato sono stati liofilizzati 10 g di tessuto fogliare fresco; il peso secco è variato tra 1,65 g per il controllo non trasformato e 2,14 g per la linea T<sub>1</sub>-8-1. L'estratto ottenuto è variato da 4,03 mg per il controllo non trasformato a 70,11 mg per la linea T<sub>1</sub>-10-4.

**Tabella 9** - Quantità di tessuto fogliare liofilizzato (peso secco) e di estratto ottenuti dalle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1* e dal controllo non trasformato di *S. lycopersicum* cv. M82.

Materiale vegetale	Peso secco (g) <sup>a</sup>	Estratto (mg) <sup>b</sup>
M82 (ctr)	1,65	4,03
T <sub>1</sub> -8-1	2,14	10,02
T <sub>1</sub> -10-1	1,98	30,24
T <sub>1</sub> -10-3	1,72	50,01
T <sub>1</sub> -10-4	1,49	70,11

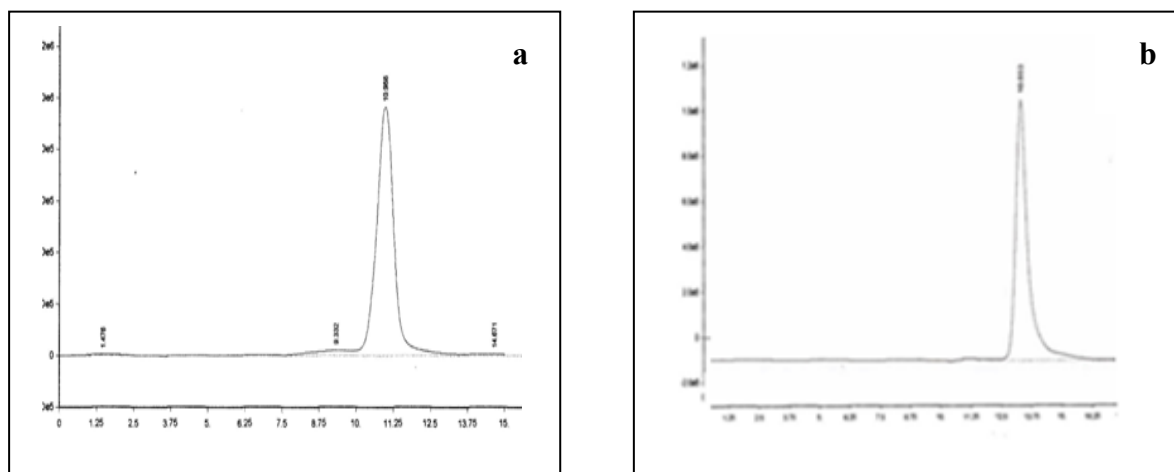
<sup>a</sup> Ottenuto da 10 g di tessuto fogliare fresco

<sup>b</sup> Ottenuto da 1 g di tessuto fogliare liofilizzato (peso secco)



L'analisi eseguita sugli estratti in paragone con lo standard di tomatina mediante TLC analitica ha evidenziato in tutti la presenza del glicoalcaloide ad un  $R_f$  di 0,63.

Tale dato è stato confermato dall'analisi eseguita mediante HPLC; nelle condizioni riportate nella parte sperimentale, il tempo di ritenzione ( $R_t$ ) della tomatina è risultato di 10,97 min. Tale picco è stato evidenziato in tutti gli estratti, sia del controllo non trasformato sia delle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1* (Figura 30).



**Figura 30** - Cromatogrammi HPLC dello standard commerciale tomatina (a) e dell'estratto organico relativo al controllo non trasformato M82 (b).

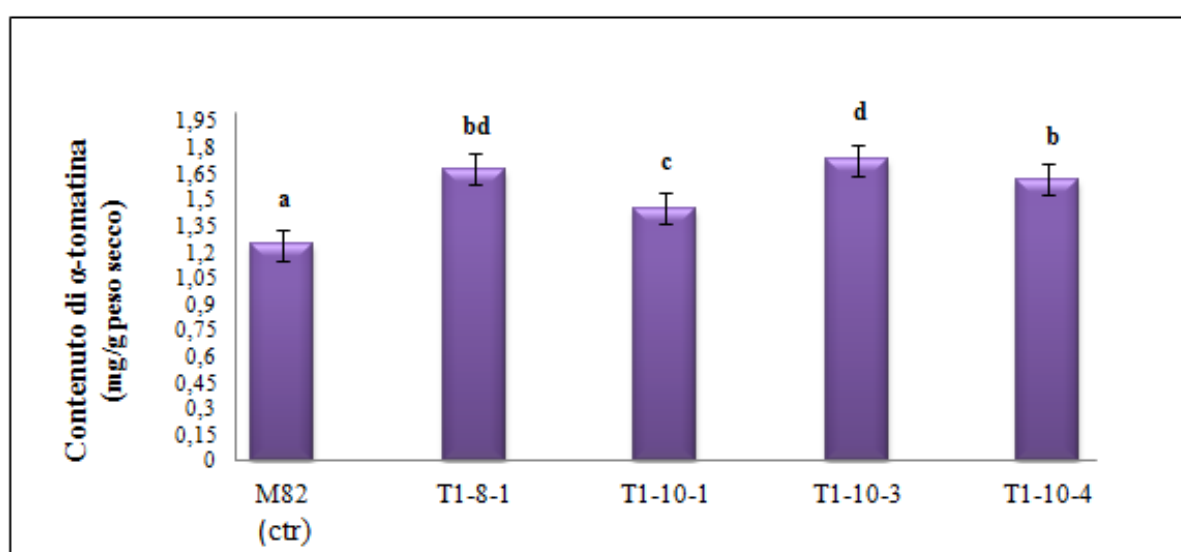
Per l'analisi quantitativa è stata costruita la retta di calibrazione; dalla soluzione madre di 0,5 mg/ml in CH<sub>3</sub>CN sono state preparate soluzioni di tomatina in un range di concentrazione di 0,5-0,0005 mg/ml. Il limite di rilevabilità è stato riscontrato alla concentrazione di  $2,5 \times 10^{-5}$  mg/ml (Tabella 10).

**Tabella 10** - Concentrazioni di tomatina utilizzate per la costruzione della retta di calibrazione.

Analita	Limite di rilevabilità (mg/ml)	$R_t$ (min)	Concentrazione (mg/ml)	$R^2(*)$
Tomatina	$2,5 \times 10^{-5}$	10,97	0,5	0,999
			0,25	
			0,05	
			0,005	
			0,0005	

(\*) Calcolato secondo l'equazione della retta  $y = ax + b$ , dove  $y$  è l'area del picco cromatografico e  $x$  la concentrazione dell'analita in mg/ml.

I dati quantitativi, ottenuti dall'analisi HPLC e calcolati secondo l'equazione della retta di calibrazione, hanno mostrato un contenuto in  $\alpha$ -tomatina degli estratti organici delle linee T<sub>1</sub>-*LeXYL1* statisticamente differente rispetto a quello del controllo non trasformato. In particolare, le quantità di  $\alpha$ -tomatina ottenute a partire da un grammo di tessuto fogliare liofilizzato sono risultate pari a 1,24 mg per il controllo, 1,67 mg per la linea T<sub>1</sub>-8-1, 1,45 mg per la T<sub>1</sub>-10-1, 1,73 mg per la T<sub>1</sub>-10-3 e 1,62 mg per la T<sub>1</sub>-10-4 (Figura 31); nelle linee transgeniche si è pertanto ottenuto un incremento del contenuto di  $\alpha$ -tomatina compreso tra il 39% della linea T<sub>1</sub>-10-3 e il 17% della linea T<sub>1</sub>-10-1 rispetto al controllo.



**Figura 31** - Contenuto di  $\alpha$ -tomatina, quantificato mediante analisi HPLC, nelle linee transgeniche T<sub>1</sub>-*LeXYL1* e nel controllo non trasformato della cv M82 di *S. lycopersicum*. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi al test di Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. DISCUSSIONE

### 4.1 Isolamento e clonaggio di geni coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina

Nonostante l'interesse per l' $\alpha$ -tomatina come fitochimico estremamente attivo (Morrisey 2009; Friedman *et al.* 2009; Shieh *et al.* 2011; Lee *et al.* 2011), molto poco si conosce circa il suo pathway biochimico e, quindi, sugli enzimi ed i geni codificanti coinvolti nella sua biosintesi. Nell'ambito del presente lavoro di tesi, sono stati isolati, clonati e caratterizzati cinque geni (*CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO*) coinvolti nel pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina che, data la natura steroidea del suo aglicone, la tomatidina, può essere ricondotto alla via biogenetica degli steroli, il cui intermedio chiave è il 2,3-epossisqualene (Corey *et al.* 1966).

La ciclizzazione del 2,3-epossisqualene rappresenta il punto di differenziazione tra la formazione degli steroli vegetali e quelli animali; infatti, in pianta, l'epossisqualene viene ciclizzato in cicloartenolo, mentre in funghi e mammiferi viene convertito, sempre attraverso una reazione di ciclizzazione, in lanosterolo (Abe *et al.* 1993). Tuttavia, di recente, è stato ipotizzato che la sintesi degli steroli vegetali avvenga secondo un doppio pathway biochimico che prevede la produzione sia del cicloartenolo sia del lanosterolo, in quanto in alcune specie, tra cui l'*Arabidopsis*, sono stati identificati geni codificanti per la lanosterolo sintasi (Suzuki *et al.* 2006; Ohyama *et al.* 2008).

In pianta esiste una specifica OSC che catalizza la sintesi del cicloartenolo, il primo metabolita tetraciclico prodotto nell'ambito del pathway biogenetico degli steroli, che prende il nome di cicloartenolo sintasi (CAS).

Nella presente tesi, è stato isolato e clonato in *S. lycopersicum* il gene *CAS1* la cui sequenza "full-length" è risultata di 2274 bp e codificante per una proteina di 758 amminoacidi con un peso molecolare di 85,78 kDa. Il confronto della sequenza del gene da noi isolato in pomodoro con le sequenze disponibili in banca dati ha portato a concludere che esiste un'elevata omologia a livello nucleotidico ed amminoacidico con il gene *CAS1* di *Arabidopsis thaliana* codificante per una cicloartenolo sintasi (Corey *et al.* 1993), oltre che con i geni delle cicloartenolo sintasi della *Withania somnifera* e del *Panax ginseng* (Kushiro *et al.* 1998). L'analisi topologica *in silico* della proteina codificata da *CAS1* ha mostrato la presenza di 2 domini transmembrana, in contrasto con le cicloartenolo sintasi di *A. thaliana* e di *P. ginseng* che ne risultano prive (Milla *et al.* 2002; Kushiro *et al.* 1998). La presenza o l'assenza di domini transmembrana negli enzimi deputati alla sintesi delle molecole steroidee e triterpenoidiche è, probabilmente, da associare alle loro funzioni biochimiche; molte proteine enzimatiche di membrana che entrano in gioco nel pathway del mevalonato, infatti, sembrano assumere un ruolo determinante anche nella sintesi delle strutture

carboidratiche delle pareti delle cellule vegetali, confermando l'esistenza di cross-talking tra diversi pathway metabolici e tra gli enzimi in essi coinvolti (Schrick *et al.* 2004; Liepman *et al.* 2010).

La strategia di clonaggio adottata per il gene *CAS1* di *S. lycopersicum*, basata su PCR di omologia, ha consentito anche l'identificazione di un secondo prodotto di amplificazione, *CAS1-β*, che ritiene un introne di 106 nucleotidi con la formazione di un codone di terminazione prematuro nella sequenza amminoacidica. Il gene *CAS1* in pomodoro è quindi putativamente interessato da un meccanismo di splicing alternativo. In pianta, i fenomeni di splicing alternativo sembrano essere piuttosto frequenti, e questo è da ascrivere, principalmente, all'importanza evolutiva che tale processo di regolazione post-trascrizionale assume negli organismi eucarioti, contribuendo a generare nuove fonti di variabilità genetica e, quindi, nuovi fenotipi (Keren *et al.* 2010). I primi studi sul fenomeno dello splicing alternativo condotti in *Arabidopsis* e riso (*Oryza sativa*) mediante il sequenziamento Sanger di cDNA/EST, indicavano, rispettivamente, che il 21,8% e il 21,2% dei geni presenti nel genoma delle due specie erano interessati da tale meccanismo di regolazione post-trascrizionale (Wang e Brendel 2006). Studi più recenti, favoriti dallo sviluppo di tecniche molecolari più avanzate quali il sequenziamento del trascrittoma (RNA-seq), hanno evidenziato che in *Arabidopsis*, almeno il 42% dei geni totali va incontro a splicing alternativo, e che questo processo si manifesta soprattutto in termini di ritenzione di introne determinando, a livello proteico, la formazione di codoni di terminazione prematuri (PTC) (Filichkin *et al.* 2010). La frequenza con la quale lo splicing alternativo genera PTC sembra non essere un fenomeno casuale; le proteine tronche e, quindi, non funzionali che scaturiscono da questo processo molecolare fungono, infatti, da veri e propri segnali per l'attivazione di due meccanismi di regolazione dell'espressione genica: il "Nonsense Mediated mRNA Decay" (NMD) e il "Regulated Unproductive Splicing and Translation" (RUST). L'NMD comporta la degradazione selettiva degli mRNA che presentano codoni di terminazione prematuri, evitando l'accumulo di proteine tronche che potrebbero acquisire funzionalità indesiderate per la cellula (Chang *et al.* 2007). In pianta l'NMD è regolato da due processi: uno comporta la degradazione degli mRNA che presentano lunghe regioni 3'-UTR, l'altro determina la degradazione dei trascritti in cui si ha la ritenzione degli introni (Kerényi *et al.* 2008). Questo meccanismo di regolazione post-trascrizionale è evolutivamente molto conservato nell'ambito di diverse specie; infatti, è stato riscontrato in lievito, nematodi, *Drosophila* e in varie classi di vertebrati, soprattutto nei mammiferi (Conti e Izaurralde 2005). Il modello regolativo definito RUST è stato, invece, proposto ad indicare una modalità di regolazione negativa dell'espressione genica che sfrutta un evento di splicing per generare isoforme non produttive che sono degradate dall'NMD anziché tradotte in proteina (Lareau *et al.* 2007). In letteratura, sono riportati diversi esempi di geni regolati dai meccanismi sopra descritti, ad esempio, in *Arabidopsis*,

il gene *AtGRP7*, coinvolto nella regolazione dei ritmi circadiani, controlla i propri livelli di trascritto generando un sito di splicing alternativo, con la produzione di un PTC che inattiva la proteina quando il gene viene overespresso (Staiger *et al.* 2003). Il gene *Pi-ta* di *O. sativa*, che conferisce resistenza al fungo *Magnaporthe oryzae*, va incontro ad un processo di splicing alternativo in grado di generare dodici diversi trascritti coinvolti nella regolazione dei meccanismi di resistenza a varie razze del patogeno (Costanzo e Jia 2009).

Al fine di verificare il ruolo delle due isoforme di *CASI* di pomodoro nei diversi organi e nelle diverse specie, abbiamo analizzato i loro profili trascrizionali. Dall'analisi di espressione, condotta in diversi organi (foglia, frutto verde e frutto rosso) di *S. lycopersicum* e specie selvatiche di pomodoro (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. neorickii*, *S. pennellii* e *S. pimpinellifolium*), si è evidenziata una regolazione tessuto e specie-specifica delle due isoforme, con un maggior accumulo del trascritto funzionale privo di introne (*CASI*). Il diverso pattern di espressione osservato in foglia e nei frutti a diverso stadio di maturazione è, probabilmente, da associare alla diversa regolazione che il pathway degli steroli ha tra le parti riproduttive e vegetative della pianta del pomodoro (De Vos *et al.* 2011). Analogamente a quanto da noi riscontrato per *CASI*, anche il gene *ZmrbohB* di *Zea mays* che codifica per una proteina coinvolta nel processo di "burst" ossidativo, va incontro ad un fenomeno di splicing alternativo che determina la formazione di un'isoforma (*ZmrbohB-β*) che ritiene un introne di 11 nucleotidi, con la conseguente formazione di un PTC; l'analisi di espressione delle due isoforme mostra pattern diversi nei vari organi della pianta ed in risposta ai differenti stadi di sviluppo, con una prevalenza del trascritto funzionale privo di introne (Lin *et al.* 2009). Inoltre, anche in *Triticum durum*, è stato osservato che il meccanismo di ritenzione di introni a carico dei geni *Tdpmei*, coinvolti nella sintesi delle pectine, regola l'attività organo e tessuto-specifica delle diverse isoforme geniche con effetti sulla crescita e sullo sviluppo della pianta (Rocchi *et al.* 2011). L'analisi dei livelli di trascritto delle isoforme del gene *CASI* è stata condotta anche in diverse specie di pomodoro, evidenziando un diverso pattern di espressione delle due isoforme. Anche in questo caso sembra che la regolazione dello splicing alternativo a carico del gene *CASI* sia strettamente associata al diverso profilo metabolico che caratterizza le diverse specie di pomodoro. Infatti, studi condotti mediante analisi GC-MS, hanno mostrato che i profili metabolici di *S. pennellii* e *S. pimpinellifolium* sono simili a quelli di *S. lycopersicum* che, al contrario, presenta un pattern metabolico molto diverso da quello di *S. neorickii*, *S. chmielewskii* e *S. habrochaites* (Schauer *et al.* 2004).

Esperimenti di mutagenesi inserzionale condotti in *A. thaliana* sul gene *CASI* codificante per la cicloartenolo sintasi hanno dimostrato che la sua mutazione comporta un accumulo di ossidosqualene e lo sviluppo di germogli albini a causa della foto-ossidazione dei plastidi in cui si

ha un ridotto accumulo di carotenoidi e clorofille, evidenziando un ruolo cruciale, prima sconosciuto, degli steroli nella biogenesi plastidiale (Babiychuk *et al.* 2008). Nell'esperimento condotto su piante di *S. lycopersicum* cv. SM allevate in condizioni di fotoperiodo naturale e di buio continuo, è stato possibile confermare, mediante l'analisi semiquantitativa dell'espressione delle due isoforme del gene *CAS1*, il coinvolgimento di quest'ultimo nella risposta agli stimoli luminosi. L'isoforma funzionale del gene della cicloartenolo sintasi, infatti, si esprime maggiormente in presenza di luce, mentre, al buio, la quantità di trascritto si riduce; parallelamente, nella condizione di buio continuo, si può constatare un aumento dei livelli di espressione di *CAS1-β*. Questo risultato sembra indicare un coinvolgimento delle due isoforme di *CAS1* nella risposta allo stress luminoso; in letteratura è riportato che questi meccanismi di regolazione post-trascrizionale in condizioni di stress sembrano essere piuttosto comuni; ad esempio, i geni *SR* di *Arabidopsis* che codificano per proteine ricche in serina ed arginina e che fungono da regolatori dello "spliceosoma" vengono diversamente regolati in presenza di stress da alte o basse temperature, o in presenza di specifici ormoni, andando incontro ad un meccanismo di splicing alternativo che, partendo dai 15 trascritti presenti nel genoma della crucifera, genera 95 diverse isoforme che sembrano giocare un ruolo determinante nella risposta della pianta alle diverse condizioni ambientali (Palusa *et al.* 2007). Inoltre, sempre in *Arabidopsis*, stress abiotici quali elevata irradiazione luminosa e alta salinità, determinano una variazione nell'espressione dei geni *atSR45a* e *atSR30* (omologhi dei geni *SR*), che in condizioni di stress mostrano un maggior accumulo del trascritto prodotto dallo splicing alternativo (Tanabe *et al.* 2006). Anche in mais il gene *ZmCOI6.1*, la cui funzione è ancora sconosciuta, è soggetto a splicing alternativo e produce due trascritti i cui livelli dipendono dal tipo di stress abiotico a cui le piante sono soggette (Guerra-Peraza *et al.* 2009).

Come abbiamo precedentemente riportato, il gene *CAS1* codifica per l'enzima della cicloartenolo sintasi, il primo ad entrare in gioco nel punto di ramificazione del pathway biogenetico degli steroli vegetali e animali. A tal proposito, bisogna sottolineare che gli steroli di pianta e funghi presentano un gruppo alchilico in posizione C-24 che è assente negli steroli dei vertebrati (Benveniste 1986); questa reazione di alchilazione viene catalizzata da una S-adenosilmetionina (AdoMet)-sterol-C-metiltransferasi (*SMT*) (Benveniste 2004). In pianta esistono almeno tre isoforme del gene *SMT* per la regolazione del pathway biogenetico dei fitosteroli (Neelakandan *et al.* 2009). Il cicloartenolo costituisce il substrato della prima reazione di metilazione catalizzata da *SMT1* per la produzione del 24-metilene cicloartenolo (Nes *et al.* 1991), mentre il 24-metilene lofenolo è il substrato utilizzato nella seconda reazione di metilazione catalizzata dagli enzimi *SMT2* o *SMT3* per la formazione del 24-etilidene lofenolo (Rahier e Taton 1986).

Nel presente lavoro di tesi è stato clonato in pomodoro il gene *SMT1* codificante per una sterolo-metiltransferasi 1. L'analisi *in silico* della sequenza nucleotidica ed amminoacidica del gene *SMT1* ha evidenziato un elevato grado di identità con il gene *Ntsmt1* di *N. tabacum* (Bouvier-Navè *et al.* 1998). L'espressione di *Ntsmt1* in un mutante *erg6* di lievito, ha mostrato che tale gene converte efficacemente il cicloartenolo in 24-metilene cicloartanolo in presenza di AdoMet, ma che non è in grado di produrre 24-etilidene lofenolo in presenza di 24-metilene lofenolo (Bouvier-Navè *et al.* 1997). La struttura proteica di SMT1 di *S. lycopersicum* non ha presentato domini transmembrana; questo ci ha portato ad ipotizzare che la sterolo 24-C-metiltransferasi di pomodoro da noi clonata appartiene alla classe delle SMT1 che catalizzano il primo step della via biogenetica degli steroli. Infatti, studi condotti da Nes (2000) dimostrano che le SMT2 posseggono un dominio idrofobico di circa 25 amminoacidi nella regione N-terminale delle proteine che conferisce loro una localizzazione all'interno delle membrane cellulari, mentre le SMT1, essendo prive di tale dominio idrofobico, risultano solubili e, quindi, localizzate nel citoplasma. L'analisi della sequenza amminoacidica dedotta del gene *SMT1* da noi isolato in pomodoro ha evidenziato la presenza di quattro regioni altamente conservate (I, II, III and IV). Le regioni I, III e IV sono tipici motivi proteici che caratterizzano un elevato numero di metil transferasi S-adenosil-L-metionina-dipendenti, come già riportato da Kagan e Clarke (1994). La regione II, che corrisponde al motivo ricco in G caratteristico delle metil transferasi AdoMet-dipendenti, è presente anche in lievito (Venkatramesh *et al.* 1996), in soia (Shi *et al.* 1996) e nell'endosperma del mais (Grebenok *et al.* 1997).

Per quanto concerne il gene *SMT1* di pomodoro, nella presente tesi, è stata definita anche l'organizzazione genomica. Il gene *SMT1* presenta 13 esoni separati da 12 introni, di cui, in particolare, otto risultano in fase "0" e quattro in fase "2". Studi comparativi basati sui pattern introni/esoni hanno mostrato che i geni *SMT* si dividono in tre classi principali: la classe 1 comprende i geni con cinque introni, la classe 2 quelli con 11-13 introni e la classe 3 i geni privi di introni (Neelakandan *et al.* 2009); le *SMT1* di pianta, generalmente, presentano dai cinque ai dodici introni (Neelakandan *et al.* 2009). Inoltre, nel gene *SMT1* di *S. lycopersicum*, predominano gli introni in fase "0", con una scarsa presenza della fase "2" e l'assenza della fase "1". Questo dato è in accordo con quanto riportato da Neelakandan e collaboratori (2009) che, nei loro studi filogenetici sulle sterolo C24-metiltransferasi di pianta, hanno mostrato una rara presenza di introni in fase "1".

Nel pathway metabolico degli steroli l'obtusifoliolo viene trasformato in (4 $\alpha$ )-metil-(5 $\alpha$ )-ergosta-8,14,24(28)-trien-3 $\beta$ -olo mediante una reazione di 14- $\alpha$ -demetilazione regolata, in animali, funghi, piante e *Mycobacterium tuberculosis*, dall'enzima CYP51 (Burger *et al.* 2003).

Nel presente lavoro di tesi, è stato isolato il gene codificante per una obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi che appartiene alla vasta famiglia genica del citocromo P450, diffusa in tutto il regno vegetale (Nelson *et al.* 2004). In pomodoro, è stato precedentemente isolato un altro membro della famiglia delle P450 (CYP710A1); questo enzima è responsabile della reazione di desaturazione in posizione C-22 a partire dal  $\beta$ -sitosterolo (Morikawa *et al.* 2006). La regione conservata di legame con il gruppo eme di CYP51 di *S. lycopersicum* si differenzia da quella caratteristica della CYP51 fungina e dei vertebrati in virtù di una sostituzione glicina-arginina, che pare si verifichi in luogo della sostituzione serina-fenilalanina che, invece, caratterizza le CYP51 di pianta, come quella del sorgo (Bak *et al.* 1997). Mutazioni nel gene *cyp51* in pianta, determinano, generalmente, fenotipi letali, indicando che lo step metabolico catalizzato da tale enzima gioca un ruolo cruciale non solo nel pathway degli steroli, ma, in generale, nell'intero sviluppo della pianta (Burger *et al.* 2003; O'Brien *et al.* 2005).

Nell'ambito del pathway degli steroli, successivamente all'enzima CYP51 interviene una sterolo C-14 reduttasi (FK) che catalizza la conversione del (4 $\alpha$ )-metil-(5 $\alpha$ )-ergosta-8,14,24(28)-trien-3 $\beta$ -olo in (4 $\alpha$ )-metilfecosterolo; questo step metabolico è altamente conservato negli eucarioti (Benveniste 1986; Taton *et al.* 1989).

La sequenza amminoacidica dedotta del gene *FK* da noi isolato in *S. lycopersicum* ha mostrato omologia con altre sterolo reduttasi di altre specie, dai vertebrati al lievito. I più alti livelli di identità sono stati riscontrati con l'enzima FK di *A. thaliana*, una proteina di 369 amminoacidi con un peso molecolare, una composizione in leucina e la presenza di otto-nove domini transmembrana molto simili a quelli osservati per la sterolo reduttasi del pomodoro (Schrack *et al.* 2000). La presenza di un numero così elevato di domini transmembrana, indica che gli enzimi FK risultano quasi interamente idrofobici e, pertanto, trovano la loro localizzazione a livello delle membrane plasmatiche o nel reticolo endoplasmatico (Jang *et al.* 2000). I due domini conservati ERG4/ERG24 e ICMT ed il motivo amminoacidico LLXSGYWGXRRH, riscontrati nella sequenza dell'enzima FK di *S. lycopersicum*, sono presenti anche nella sequenza amminoacidica di altre sterolo reduttasi di pianta come quella di *A. thaliana* (Schrack *et al.* 2000).

La formazione degli steroli vegetali prevede la rimozione di due gruppi metilici in C-4 a carico del 24-metilene cicloartenolo, reazione catalizzata da una sterolo metilossidasi (Akhtar *et al.* 1978).

In questo lavoro di tesi è stato isolato e clonato, in pomodoro, il gene *SMO* che ha mostrato un elevato livello di omologia con le sterol metilossidasi di *A. thaliana* e *R. communis*. La proteina dedotta del gene *SMO* di pomodoro presenta i domini funzionali caratteristici delle metilossidasi di pianta, quali il motivo amminoacidico HXXH ed il dominio ERG3 (Benveniste, 2004); inoltre,



l'analisi topologica di SMO, ha evidenziato la presenza di cinque domini transmembrana, suggerendo un elevato grado di idrofobicità tipico di tutte le sterolo metilossidasi e una localizzazione al livello delle membrane cellulari (Darnet *et al.* 2001). In *Arabidopsis* sono state identificate due diverse famiglie di geni *SMO*, *SMO1* e *SMO2* (Darnet *et al.* 2001); le differenze strutturali che caratterizzano gli enzimi appartenenti a queste due classi non sono ancora state delineate. Tuttavia, esperimenti di silenziamento mediante VIGS (Virus Induced Gene Silencing) dei geni *SMO1* e *SMO2* in *N. benthamiana*, hanno consentito di distinguere i substrati con cui le due diverse classi di enzimi mostrano maggiore affinità; le *SMO1* utilizzano il 4,4 $\alpha$ -dimetil sterolo, mentre le *SMO2* utilizzano il 4,4 $\alpha$ -metil sterolo (Darnet e Rahier 2004). L'elevata identità (80%) della sequenza amminoacidica dedotta del gene *SMO* di *S. lycopersicum* con la sequenza del gene *AtSMO2* di *Arabidopsis* ci ha consentito di ipotizzare che il gene isolato in pomodoro potrebbe appartenere alla famiglia delle *SMO2*.

Nel presente lavoro di tesi, mediante analisi RT-PCR semiquantitativa sono stati valutati i livelli di espressione dei geni *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* in diversi organi e specie di pomodoro.

I geni oggetto di studio hanno mostrato un'espressione differenziale nei diversi organi del pomodoro coltivato e nelle diverse specie *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicoides*, *S. neorickii*, *S. pennellii* e *S. pimpinellifolium*. I livelli di espressione genica sono risultati complessivamente più elevati in frutto verde rispetto al frutto rosso. E' importante sottolineare che le variazioni nel contenuto, nella composizione e nella coniugazione degli steroli sono strettamente associate al processo di maturazione della bacca (Duperon *et al.* 1983); Whitaker e Gapper (2008) hanno riportato, infatti, che nel frutto maturo di pomodoro prevalgono lo stigmasterolo ed il  $\beta$ -sitosterolo.

Oltre ad un'espressione organo-specifica, i geni *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* hanno mostrato un'espressione differenziale anche a livello di specie: infatti, *S. neorickii* (acc. LA2133), *S. habrochaites* (acc. LA1777) e *S. pimpinellifolium* (acc. LA1589) hanno mostrato il più elevato accumulo di trascritto per *SMT1*, *CYP51* e *FK*; i livelli di espressione di *SMO* sono risultati generalmente più bassi rispetto agli altri geni in tutte le specie analizzate, con un livello di trascritto maggiore solo in *S. habrochaites* (acc. LA1777). Analisi GC-MS condotte su tessuto fogliare e frutti di *S. lycopersicum* e di cinque specie selvatiche (*S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium* e *S. pennellii*) hanno mostrato pattern metabolici, in termini di steroli, terpeni, saponine ed alcaloidi, estremamente diversificati tra la specie coltivata ed i parentali selvatici; in particolare, *S. pimpinellifolium* ha mostrato il profilo metabolico più simile a quello di *S. lycopersicum*, mentre *S. habrochaites* è risultata la specie più diversificata, in termini di pattern biochimico, rispetto a quella coltivata (Schauer *et al.* 2005). Questi dati, che evidenziano

meccanismi di regolazione specie-specifici dei pathway metabolici deputati alla produzione di molecole biologicamente attive, giustificano i pattern di espressione specie-specifici riscontrati nel presente lavoro di tesi in relazione ai geni *CAS1*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO*. In pomodoro, sembra che il profilo metabolico delle specie selvatiche, soprattutto in termini di steroli, triterpeni e molecole da essi derivati, sia alla base della loro resistenza verso vari agenti fitopatogeni (López-Gresa *et al.* 2010). Nei tricomi di *S. habrochiates*, ad esempio, è stato osservato un maggior accumulo di molecole sesquiterpeniche rispetto a quelle monoterpeniche, abbondanti, invece, in *S. lycopersicum* (Besser *et al.* 2009), oltre ad un più elevato contenuto di  $\alpha$ -tomatina e deidrotomatina rispetto a quello osservato nella specie coltivata (McDowell *et al.* 2011).

Ulteriori studi saranno utili a delucidare meglio il ruolo che i geni *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* svolgono nella regolazione del pathway degli steroli e quindi delle molecole da essi derivati, come l' $\alpha$ -tomatina, consentendo anche una maggiore caratterizzazione dei possibili cross-talking metabolici esistenti in pianta.

## **4.2 Isolamento e clonaggio di geni coinvolti nel pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina**

Se le conoscenze inerenti il pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina sono ancora piuttosto limitate a dispetto delle numerose informazioni che invece sono ascrivibili alle sue attività biologiche, ancora meno noti sono i meccanismi che regolano la degradazione di questo metabolita in pianta. E' noto, però, che il contenuto di  $\alpha$ -tomatina varia nel corso della maturazione del frutto di pomodoro dove, infatti, i suoi livelli di concentrazione si riducono di circa il 94% rispetto alla bacca immatura (Kozukue e Friedman 2003) e che, anche nelle parti vegetative della pianta, le quantità del glicoalcaloide variano da circa 16285 a 521  $\mu\text{g/g}$  di peso fresco, suggerendo l'esistenza di un meccanismo di degradazione tessuto-specifico che interessa tutti gli organi della pianta (Kozukue *et al.* 2004).

La maggior parte delle informazioni disponibili sul catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, sono ascrivibili ai meccanismi di detossificazione del glicoalcaloide messi in atto da alcuni funghi patogeni del pomodoro, quali *Botrytis cinerea*, *Septoria lycopersici*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Quidde *et al.* 1998; Lairini *et al.* 1996). Questi organismi, generalmente, producono enzimi che vanno ad agire sulla catena saccaridica del licotetraosio, convertendo l' $\alpha$ -tomatina in composti meno tossici (Roldán-Arjona *et al.* 1999); ad esempio, il fungo patogeno *B. cinerea* sintetizza una tomatinasi che, rimuovendo la molecola di xilosio terminale dalla frazione saccaridica dell' $\alpha$ -tomatina, la trasforma in  $\beta$ 1-tomatina (Quidde *et al.*

1998), mentre la tomatinasi della *S. lycopersici* è in grado di idrolizzare il legame  $\beta$ -1,2-glucosidico del licotetraosio convertendo l' $\alpha$ -tomatina in  $\beta$ 2-tomatina (Sandrock *et al.* 1995). Inoltre, le tomatinasi del *F. solani* e del *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* scindono il legame glicosidico che unisce il licotetraosio all'aglicone (Lairini *et al.* 1996). La capacità di deglicosilazione dell' $\alpha$ -tomatina è stata ascritta anche ad una tomatinasi prodotta dall'attinomicete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Kaup *et al.* 2005).

Nel presente lavoro di tesi, al fine di individuare un enzima del pomodoro coinvolto nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, è stata condotta l'analisi BLAST della sequenza amminoacidica dedotta del gene *Xyl* (acc. number U24701) di *S. lycopersici* contro il genoma di *S. lycopersicum*. L'analisi *in silico* ci ha consentito di individuare due geni del pomodoro, *LeXYL1* e *LeXYL2*, che mostravano, rispettivamente, il 24% e il 23% di identità con la tomatinasi fungina; entrambi i geni codificano per delle  $\beta$ -D-xilosidasi, enzimi generalmente deputati alla degradazione dei polisaccaridi delle pareti cellulari e dunque coinvolti nei processi di "softening" che entrano in gioco nel corso della maturazione del frutto (Goulao e Oliveira 2008). Studi di espressione dei geni *LeXYL1* e *LeXYL2* condotti in pomodoro da Itai e collaboratori (2003) hanno evidenziato che *LeXYL2* presenta profili di espressione caratteristici dei geni coinvolti nella maturazione della bacca, esprimendosi molto nelle sue fasi iniziali e più debolmente negli stadi tardivi, mentre *LeXYL1* presenta livelli di accumulo del trascritto maggiori nel frutto a piena maturazione. Il comportamento inatteso del gene *LeXYL1* rispetto alle altre xilosidasi, oltre che la sua omologia con la tomatinasi della *S. lycopersici*, ci ha portato ad ipotizzare un suo possibile coinvolgimento nel processo di degradazione dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro.

E' stata quindi condotta l'analisi trascrizionale del gene *LeXYL1*, mediante Real Time PCR in foglia, frutto verde e frutto rosso di *S. lycopersicum* cv. SM e della variante andina *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (LA2213) che mostra elevati contenuti di  $\alpha$ -tomatina anche nel frutto rosso (Rick *et al.* 1994). L'analisi ha mostrato che nel genotipo andino il livello di espressione di *LeXYL1* risulta simile in frutto verde e frutto rosso, mentre nella cv. SM l'espressione del gene è risultata elevata in frutto rosso, dove il glicoalcaloide è presente in ridotte quantità, e debole in frutto verde dove, invece, i livelli di  $\alpha$ -tomatina sono più elevati (Kozukue *et al.* 2004). Questi risultati hanno avvalorato la nostra ipotesi del possibile coinvolgimento di *LeXYL1* nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina e ci hanno portato a condurre lo studio funzionale di questo gene mediante approcci di overespressione e silenziamento.

Per l'overespressione di *LeXYL1*, si è proceduto con il suo clonaggio nel vettore PG0029 contenente il promotore costitutivo del gene 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV); tuttavia, la trasformazione degli espianti cotiledonari della cv. M82 di *S. lycopersicum* mediante

agrobatterio, non ci ha consentito di ottenere rigeneranti, a causa degli effetti letali determinati proprio dall'overespressione costitutiva del gene. Esempi di fenomeni simili legati all'overespressione di alcuni geni di pianta, sono riportati in letteratura; ad esempio, l'overespressione del gene codificante per la proteina ribosomale S27a di *N. benthamiana* induce la proliferazione di cellule indifferenziate e il blocco del normale sviluppo del germoglio con conseguente mortalità degli espianti (Hanania *et al.* 2009); in pomodoro, l'overespressione del gene *ANTHOCYANIN1*, coinvolto nella sintesi delle antocianine, determina un'elevata percentuale di letalità a carico degli embrioni (Schreiber *et al.* 2011).

Data, dunque, l'impossibilità di ottenere piante di pomodoro in grado di overesprimere *LeXYL1*, abbiamo deciso di realizzare lo studio funzionale del gene con un approccio basato sul silenziamento mediante "RNA interference" (RNAi).

L'RNAi è un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) descritto, per la prima volta, nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998), e successivamente caratterizzato in piante, animali e funghi (Geley e Muller, 2004). La sua attivazione è indotta dalla presenza di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) che vengono sequestrate dalla ribonucleasi Dicer per essere degradate in piccole molecole di 21-25 nucleotidi, definite "small-interfering RNA" (siRNA) (Bernstein *et al.* 2001). Gli siRNA legano, successivamente, il complesso proteico RISC (RNA-Induced Silencing Complex) che ne degrada uno dei filamenti lasciando integro quello antisenso per poi cercare, nella cellula, gli mRNA ad esso complementari, con i quali va a formare nuovamente dei dsRNA che vengono degradati dall'azione di una RNAsi, con conseguente abbattimento dei livelli di trascritto del gene endogeno individuato dal complesso RISC-siRNA (Kusaba 2004).

L'RNAi è stato inizialmente descritto come un meccanismo di difesa messo in atto dalla cellula per contrastare gli attacchi virali (Wilkins *et al.* 2005); solo successivamente, studi più approfonditi, ne hanno evidenziato ruoli più complessi che vanno dalla regolazione dell'espressione genica (Voinnet 2009) al controllo epigenetico (Matzke *et al.* 2009). Non è un caso, quindi, che oggi, esso rappresenti uno degli strumenti molecolari più utilizzati per lo studio e la caratterizzazione di geni di interesse in diversi organismi, tra cui quelli vegetali (McGinnis 2010).

In pianta, infatti, sono numerosi gli esempi di approcci di genetica funzionale basati su RNAi; è il caso del gene *OsGSRI* di *O. sativa*, caratterizzato, in seguito al suo silenziamento, come uno dei geni chiave dei pathway metabolici delle gibberelline e dei brassinosteroidi (Wang *et al.* 2009). Il clonaggio del gene *StKCS6* di *S. tuberosum* in una cassetta RNAi, ne ha mostrato un ruolo determinante nei meccanismi di produzione di suberina e cere (Serra *et al.* 2009); approcci analoghi di silenziamento genico sono stati portati avanti anche in canna da zucchero, al fine di caratterizzare

geni regolatori di tratti nutrizionali e qualitativi (Osabe *et al.* 2009), e in *Arabidopsis*, con l'obiettivo di condurre un'analisi funzionale di alcuni geni plastidiali (Zhai *et al.* 2009).

L'applicazione di approcci RNAi per studi funzionali di geni di interesse, ha riguardato anche il pomodoro; un esempio è ascrivibile al gene *LIN5* di *S. lycopersicum*, per il quale, lo studio basato sul silenziamento, ne ha reso possibile l'identificazione come uno dei principali regolatori della sintesi dei solidi solubili (Zanor *et al.* 2009). Sempre in pomodoro, la sottoespressione dei geni *TAGL1* e *SLAP2a* ha permesso di dimostrare la loro funzione cruciale nella regolazione della maturazione della bacca (Vrebalov *et al.* 2009; Chung *et al.* 2010). Nel 2005, Davuluri e collaboratori, clonando il gene di pomodoro *DAT1*, coinvolto nel processo della fotomorfogenesi, in un costrutto RNAi sotto il controllo di promotori frutto-specifici, hanno ottenuto un significativo incremento di flavonoidi e carotenoidi nella bacca, dimostrando che l'intervento su un gene regolatore può determinare la produzione di diversi fitonutrienti mediante l'attivazione di più pathway metabolici, e che, quindi, il silenziamento genico può rappresentare uno degli approcci più indicati per il miglioramento delle proprietà nutrizionali e qualitative di specie di interesse agrario.

Nel presente lavoro di tesi, la messa a punto di un costrutto RNAi per la caratterizzazione funzionale di *LeXYL1*, ha consentito di ottenere undici trasformanti (T<sub>0</sub>) e di selezionare, mediante RT-PCR semiquantitativa, nell'ambito della generazione T<sub>1</sub>, quattro piante (T<sub>1</sub>-8-1, T<sub>1</sub>-10-1, T<sub>1</sub>-10-3 e T<sub>1</sub>-10-4) che hanno mostrato una sottoespressione del gene; questa strategia, dunque, è risultata idonea all'ottenimento di rigeneranti vitali, contrariamente a quanto si era verificato con l'approccio dell'overespressione.

Le linee T<sub>1</sub>-*LeXYL1* sono state analizzate morfologicamente, ed è stato evidenziato che esse non presentavano differenze statisticamente significative rispetto al controllo non trasformato, fatta eccezione per la linea T<sub>1</sub>-10-4 che ha presentato un minor numero di tricomi, e per la T<sub>1</sub>-10-3 che ha mostrato valori significativamente differenti rispetto al controllo per i soli parametri riferiti all'altezza della pianta e al numero di internodi; in generale, comunque, possiamo asserire che il silenziamento di *LeXYL1* non ha avuto effetti determinanti sullo sviluppo della parte vegetativa della pianta. Gli effetti fenotipici legati alla trasformazione di costrutti RNAi, d'altra parte, sono generalmente correlati alla funzione svolta dal gene che viene silenziato (McGinnis *et al.* 2005); ad esempio, una sottoespressione indotta dall'RNAi a carico del gene *LeCCR1* di *S. lycopersicum*, coinvolto nella sintesi della lignina, comporta una significativa riduzione della taglia delle piante trasformate rispetto al controllo, e questo in virtù del ruolo chiave svolto dal gene nel controllo della sintesi di questo metabolita essenziale per garantire il corretto sviluppo dei tessuti vascolari della pianta (Van der Rest *et al.* 2006). Analogamente, la sottoespressione mediata dall'RNAi del gene *WOX4* di *Arabidopsis*, coinvolto nello sviluppo del procambio, causa un fenotipo di taglia molto

ridotta rispetto alle piante controllo, in conseguenza di una minore crescita e differenziazione dei tessuti xilematici e floematici (Ji *et al.* 2010). L'assenza di tratti morfologici alterati in pomodoro a seguito al silenziamento di *LeXYLI* suggerisce che quest'ultimo è, probabilmente, coinvolto in processi metabolici che non influenzano lo sviluppo vegetativo della pianta. D'altra parte è stato osservato che, in *Arabidopsis*, esperimenti di silenziamento a carico del gene *AtBXL1*, putativamente codificante per una  $\beta$ -D-xilosidasi coinvolta nel metabolismo della parete cellulare e nello sviluppo della pianta, determinano l'insorgenza di fenotipi alterati, caratterizzati da foglie con bordi arricciati, minore produzione di semi e silique più piccole rispetto alle piante controllo (Goujon *et al.* 2003). In pomodoro, inoltre, il silenziamento mediante RNAi del gene *INVINH1*, codificante per un inibitore di invertasi coinvolto nel metabolismo della parete cellulare, comporta un fenotipo caratterizzato da ritardata senescenza fogliare, aumento del peso dei semi e maggior accumulo di esosi nei frutti (Jin *et al.* 2009).

Per delucidare, quindi, il ruolo di *LeXYLI*, e per poter avvalorare la nostra ipotesi di un suo possibile coinvolgimento nel catabolismo dell' $\alpha$ -tomatina, abbiamo determinato il contenuto del glicoalcaloide nelle linee T<sub>1</sub>-*LeXYLI*.

A tale scopo, ne abbiamo effettuato un'estrazione in ambiente acido secondo quanto riportato da Friedman e Levin (1998). Per l'analisi quantitativa si è proceduto con la messa a punto di un metodo cromatografico HPLC, una delle tecniche più utilizzate per la quantificazione di metaboliti di interesse a partire da matrici organiche di diversa natura (Issaq *et al.* 2009). Il ricorso all'HPLC per la quantificazione dell' $\alpha$ -tomatina da diversi tessuti, specie e genotipi di pomodoro, è stato descritto da diversi autori, i quali si sono generalmente avvalsi dell'utilizzo di colonne cromatografiche C18 a fase inversa (Friedman *et al.* 1994; Leonardi *et al.* 2000; Distl e Wink, 2009).

Nel presente lavoro di tesi, è stato messo a punto un nuovo protocollo di analisi HPLC dell' $\alpha$ -tomatina, utilizzando una colonna ad esclusione molecolare ed una fase mobile costituita da un tampone fosfato a pH acido. Questo metodo ci ha consentito di ottenere e caratterizzare i profili cromatografici dello standard commerciale di tomatina e degli estratti organici ottenuti dalla linee transgeniche e dal controllo, evidenziando, per ciascuno di essi, la presenza del solo picco associato al glicoalcaloide. Il contenuto di  $\alpha$ -tomatina, calcolato mediante la retta di calibrazione, è variato tra 1,24 mg/g per il controllo non trasformato e 1,73 mg/g per la linea T<sub>1</sub>-10-3.

L'analisi quantitativa ci ha consentito di verificare che in tutte le linee che hanno mostrato una sottoespressione del gene *LeXYLI*, il contenuto di  $\alpha$ -tomatina è risultato incrementato in maniera statisticamente significativa. L'analisi funzionale condotta per il gene *LeXYLI* adottando la

strategia del silenziamento ci ha quindi consentito di dimostrare il coinvolgimento di questo gene nel catabolismo del glicoalcaloide in pomodoro.

## 5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi si proponeva, come obiettivo principale, quello di indagare il pathway metabolico dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro mediante l'isolamento e la caratterizzazione dei geni chiave coinvolti nel suo processo di sintesi e di degradazione. I risultati ottenuti nell'ambito dello **studio del pathway anabolico dell' $\alpha$ -tomatina** possono essere così riassunti:

- sono stati isolati e clonati i geni *CASI* (cicloartenolo sintasi), *SMT1* (sterol metil transferasi), *CYP51* (obtusifoliol-14 $\alpha$ -demetilasi), *FK* (sterol C-14 reduttasi) e *SMO* (sterol 4- $\alpha$ -metilossidasi), coinvolti nelle prime fasi della biosintesi dell' $\alpha$ -tomatina;
- è stata definita la struttura esone-introne del gene *SMT1*;
- è stato identificato un putativo sito di splicing alternativo a carico del gene *CASI* ed è stato ottenuto il profilo di espressione delle due isoforme del gene *CASI* in risposta a stress luminoso;
- sono stati ottenuti i profili di espressione dei geni *CASI*, *SMT1*, *CYP51*, *FK* e *SMO* in diversi organi (foglia, frutto verde, frutto rosso) di *S. lycopersicum* ed in diverse specie selvatiche di pomodoro (*S. lycopersicum* cultivar SM, *S. chmielewskii*, acc. LA1028, *S. habrochaites*, acc. LA1777, *S. lycopersicoides*, acc. LA2951, *S. neorickii*, acc. LA2133, *S. pennellii*, acc. LA0716 e *S. pimpinellifolium*, acc. LA1589).

Inoltre, in riferimento allo **studio del pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina**, va evidenziato che grazie all'applicazione della strategia di genomica funzionale basata sul silenziamento ed alla messa a punto di tecniche di estrazione ed analisi dell' $\alpha$ -tomatina, è stato possibile concludere che:

- il gene *LeXYL1* codificante per una  $\beta$ -D-xilosidasi è coinvolto nel pathway catabolico dell' $\alpha$ -tomatina in pomodoro.

In conclusione, il presente lavoro di ricerca, ha contribuito ad una maggiore comprensione dei meccanismi genici che presiedono alla sintesi e alla degradazione dell' $\alpha$ -tomatina *in planta*, aprendo la strada a futuri approcci biotecnologici finalizzati alla regolazione dei pathway biochimici di questo metabolita del pomodoro dotato di interessanti proprietà biologiche.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abdi G., Hedayat M., Khush-Khui M. (2011) Development of NaCl-tolerant line in *Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir.) schultz-bip through shoot organogenesis of selected callus line. J. Biol. Environ. Sci., 5(15): 111-119.
- Abdullah M.A., ur Rahmah A., Sinskey A.J., Rha C.K. (2008) Cell engineering and molecular pharming for biopharmaceuticals. Open Med. Chem. J., 2: 49-61.
- Abe I., Rohmer M., Prestwich G.D. (1993) Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. Chem. Rev., 93(6): 2189-2206.
- Adeyemi M.M.H. (2010) The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. Afr. J. Pure Appl. Chem., 4(11): 243-246.
- Aharoni A., Galili G. (2010) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis*. J. Biotech., 118: 239-244.
- Akhtar M., Alexander K., Boar R.B., McGhie J.F., Barton D.H. (1978) Chemical and enzymic studies on the characterization of intermediates during the removal of the 14 $\alpha$ -methyl group in cholesterol biosynthesis. The use of 32-functionalized lanostane derivatives. Biochem. J., 169(3): 449-463.
- Araque P., Casanova H., Ortiz C., Henao B., Peláez C. (2007) Insecticidal activity of caffeine aqueous solutions and caffeine oleate emulsions against *Drosophila melanogaster* and *Hypothenemus hampei*. J. Agric. Food Chem., 55(17): 6918-6922.
- Avato P., Bucci R., Tava A., Vitali C., Rosato A., Bialy Z., Jurzysta M. (2006) Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. Phytother. Res., 20(6): 454-457.
- Babiychuk E., Bouvier-Navè P., Compagnon V., Suzuki M., Muranaka T., Van Montagu M., Kushnir S., Schaller H. (2008) Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. PNAS, 105(8): 3163-3168.
- Bak S., Kahn R.A., Olsen C.E., Halkier B.A. (1997) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifolius 14  $\alpha$ -demethylase of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a cytochrome P450 orthologous to the sterol 14  $\alpha$ -demethylases (CYP51) from fungi and mammals. Plant J., 11: 191-201.
- Benveniste P. (1986) Sterol Biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 37: 275-308.
- Benveniste P. (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 429-457.
- Bernstein E., Caudy A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, 409(6818): 295-296.
- Besser K., Harper A., Welsby N., Schauvinhold I., Slocombe S., Li Y., Dixon R.A., Broun P. (2009) Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. Plant Physiol., 149: 499-514.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci., 161: 839-851.
- Bouvier-Navè P., Husselstein T., Benveniste P. (1998) Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. Eur. J. Biochem., 256: 88-96.
- Bouvier-Navè P., Husselstein T., Desprez T., Benveniste P. (1997) Identification of Cdnas encoding sterol methyl-transferases involved in the second methylation step of plant sterol biosynthesis. Eur. J. Biochem., 246: 518-529.
- Burger C., Rondet S., Benveniste P., Schaller H. (2003) Virus-induced silencing of sterol biosynthetic genes: identification of a Nicotiana tabacum L. obtusifolius-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) by genetic manipulation of the sterol biosynthetic pathway in Nicotiana benthamiana L. J. Exp. Bot., 54(388):1675-1683.
- Casanova H., Ortiz C., Peláez C., Vallejo A., Moreno M.E., Acevedo M. (2002) Insecticide formulations based on nicotine oleate stabilized by sodium caseinate. J. Agric. Food Chem., 50(22): 6389-6394.

- Castillo L.E., Jimenez J.J., Delgado M.A. (2010) Secondary metabolites of the Annoaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *Trop. Subtrop. Agroecos.*, 12: 445-462.
- Chang S.B., Anderson L.K., Sherman J.D., Royer S.M., Stack S.M. (2007) Predicting and testing physical locations of genetically mapped loci on tomato pachytene chromosome 1. *Genetics*, 176: 2131-2138.
- Chiu F.L., Lin J.K. (2008) Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF- $\kappa$ B and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *FEBS Letters* 582: 2407-2412.
- Chung M.Y., Vrebalov J., Alba R., Lee J., McQuinn R., Chung J.D., Klein P., Giovannoni J. (2010) A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant J.*, 64: 936-947.
- Conti E., Izaurralde E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17(3): 316-325.
- Corey E.J., Matsuda S.P.T, Bartel B. (1993) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11628-11632.
- Corey E.J., Russey W.E., Ortiz de Montellano P.R. (1966) 2,3-Oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis of sterols from squalene. *J. Am. Chem. Soc.*, 88(20): 4750-4751.
- Costanzo S., Jia Y. (2009) Alternatively spliced transcripts of Pi-ta blast resistance gene in *Oryza sativa*. *Plant Sci.*, 177(5): 468-478.
- Darnet S., Bard M., Rahier A. (2001) Functional identification of sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidation. *FEBS Letters*, 508(1): 39-43.
- Darnet S., Rahier A. (2004) Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4 $\alpha$ -methyl oxidases. *Biochem. J.*, 378(3): 889-898.
- Davuluri G.R., van Tuinen A., Fraser P.D., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.R., Palys J., Uhlig J., Bramley P.M., Henk Pennings M.J., Bowler C. (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat. Biotech.*, 23: 890-895.
- De Vos, R.C.H., Hall R.D., Moing, A. (2011) Metabolomics of a model fruit: tomato. In: *Annual Plant Reviews, Volume 43: Biology of Plant Metabolomics* (Ed: R.D. Hall), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Dewick P.M. (1997) Medicinal natural products: a biosynthetic approach. (Eds: John Wiley & Sons Ltd). Chichester, England. pp: 362-364.
- Dillard C.J., German J.B. (2000) Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agr.*, 80(12): 1744-1756.
- Distl M., Wink M. (2009) Identification and quantification of steroidal alkaloids from wild tuber-bearing *Solanum* species by HPLC and LC-ESI-MS. *Potato Res.*, 52(1): 79-104.
- Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843-847.
- Dörnenburg H. (2008) Plant cell culture technology—harnessing a biological approach for competitive cyclotides production. *Biotechnol. Lett.*, 30(8): 1311-1321.
- Duperon R., Thiersault M., Duperon P. (1983) High level of glycosylated sterols in species of *Solanum* and sterol changes during the development of the tomato. *Phytochemistry*, 23: 743-746.
- Duradeva N., Pichersky E. (2008) Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr. Opin. Biotech.*, 19: 1-9.
- El-Raheem A., El-Shanshoury R., El-Sououd S.M., Awadalla O.A., El-Bandy N.B. (1995) Formation of tomatine in tomato plants infected with *Streptomyces* species and treated with herbicides, correlated with reduction of *Pseudomonas solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Acta. Microbiol. Pol.*, 44(3-4): 255-266.

- El-Sayed M., Verpoorte R. (2002) Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell Tiss. Org.*, 68: 265-270.
- Eltayeb E.A., Roddick J.G. (1984) Changes in the alkaloid content of developing fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Oxford University Press, 35(2): 261-267.
- Exposito O., Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M.H., Cusido R.M., Palazon J. (2009) Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Curr. Med. Chem.*, 9(1): 109-121.
- Fernandez A.I., Viron N., Alhagdow M., Karimi M., Jones M., Amsellem Z., Sicard A., Czerednik A., Angenent G., Grierson D., May S., Seymour G., Eshed Y., Lemaire-Chamley M., Rothan C., Hilson P. (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol.*, 151: 1729-1740.
- Fernie A.R., Schauer N. (2008) Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.*, 25(1): 39-48.
- Fiehn O. (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 48: 155-171.
- Filichkin S.A., Priest H.D., Givan S.A., Shen R., Bryant D.W., Fox S.E., Wong W.K., Mockler T.C. (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, 20: 45-58.
- Fire A., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Fontaine T.D., Ard J.S., Ma R.M. (1951) Tomatidine, a steroid secondary amine. *J. Am. Chem. Soc.*, 73(2): 878-879.
- Fontaine T.D., Irving G.W. Jr., et al. (1948) Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. *Arch. Biochem.*, 18(3): 467-475.
- Friedman M. (2002) Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5751-5780.
- Friedman M., Henika P.R., Mackey B.E. (1996) Feeding of potato, tomato and eggplant alkaloids affects food consumption and body and liver weights in mice. *J. Nutr.*, 126: 989-999.
- Friedman M., Henika P.R., Mackey B.E. (2003) Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 61-71.
- Friedman M., Levin C.E. (1998) Dehydrotomatine content in tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4571-4576.
- Friedman M., Levin C.E., Lee S.U., Kim H.J., Lee I.S., Byun J.O., Kozukue N.J. (2009) Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 5727-5733.
- Friedman M., Levin C.E., McDonald G.M. (1994) Alpha-Tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 42(9): 1959-1964.
- Fujisawa M., Takita E., Harada H., Sakurai N., Suzuki H., Ohyama K., Shibata D., Misawa N. (2009) Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. *J. Exp. Bot.*, 60(4): 1319-1332.
- Fukushima A., Kusano M., Redestig H., Arita M., Saito K. (2009) Integrated omics approaches in plant systems biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13: 532-538.
- Geley S., Muller C. (2004) RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Exp. Gerontol.*, 39: 985-998.
- Georgiev M.I., Weber J., Maciuk A. (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 83(5): 809-823.
- Giezen T.J., Mantel-Teeuwisse A.K., Leufkens Hubert G.M. (2009) Pharmacovigilance of Biopharmaceuticals: Challenges Remain. *Drug Safety*, 32(10): 811-817.
- Goławska S. (2007) Deterrence and toxicity of plant saponins for the pea aphid *Acyrtosiphon Pisum Harris*. *J. Chem. Ecol.*, 33(8): 1598-1606.

- González-Lamothe R., Mitchell G., Gattuso M., Diarra M.S., Malouin F., Bouarab K. (2009) Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(8): 3400-3419.
- Gopinathan M.A., Sudhakaran R. (2008) Biopesticide Research and Commercialization: Opportunities and Challenges. In: *Sustainable Crop Protection, Biopesticide Strategies*. (Eds: Koul O., Dhaliwal G.S., Kaul V.K.). Kalyani Publishers, New Delhi. 224-242.
- Goujon T., Minic Z., El Amrani A., Lerouxel O., Aletti E., Lapierre C., Joseleau J.-P., Jouanin L. (2003) AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *Plant J.*, 33: 677-690.
- Goulao L.F., Oliveira C.M. (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci. Tech.*, 19: 4-25.
- Grebenok R.J., Galbraith D.W., Della Penna D. (1997) Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: one of two types of sterol methyltransferase in higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 34: 891-896.
- Guerra-Peraza O., Thuy Nguyen H., Stamp P., Leipner J. (2009) ZmCOI6.1, a novel, alternatively spliced maize gene, whose transcript level changes under abiotic stress. *Plant Sci.*, 176(6): 783-791.
- Hanania U., Velcheva M., Sahar N., Flaishman M., Or E., Dgani O., Perl A. (2009) Suppression and overexpression of ubiquitin extension protein S27a affects cell proliferation and in vitro regeneration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Sci.*, 176(4): 566-574.
- Harvey A.L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*, 13: 894-901.
- Heal K.G., Taylor-Robinson A.W. (2010) Tomatine adjuvantation of protective immunity to a major pre-erythrocytic vaccine candidate of malaria is mediated via CD8<sup>+</sup> T cell release of IFN- $\gamma$ . *J. Biomed. Biotechnol.*, 1-7.
- Hernandez-Vazquez L., Bonfill M., Moyano E., Cusido R.M., Navarro-Ocaña A., Palazon J. (2010) Conversion of  $\alpha$ -amyrin into centellosides by plant cell cultures of *Centella asiatica*. *Biotechnology Lett.*, 32(2): 315-319.
- Huang T.K., McDonald K.A. (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem. Eng. J.*, 45(3): 168-184.
- Iriti M., Faoro F. (2009) Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(8): 3371-3399.
- Isman M.B. (2008) Perspective botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag. Sci.*, 64: 8-11.
- Issaq H.J., Van Q.N., Waybright T.J., Muschik G.M., Veenstra T.D. (2009) Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J. Sep. Sci.*, 32(13): 2183-2199.
- Itai A., Ishihara K., Bewley J.D. (2003) Characterization of expression, and cloning, of  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J. Exp. Bot.*, 54(393): 2615-2622.
- Ito S., Ihara T., Tamura H., Tanaka S., Ikeda T., Kajihara H., Dissanayake C., Abdel-Motaal F.F., El-Sayed M.A. (2007) Alpha-tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.*, 581(17): 3217-3222.
- Jang J.C., Fujioka S., Tasaka M., Seto H., Takatsuto S., Ishii A., Aida M., Yoshida S., Sheen J. (2000) A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, 14: 1485-1497.
- Ji H. F., Li X.J., Zhang H.Y. (2009) Natural products and drug discovery. *EMBO Reports*, 10(3): 194-200.
- Ji J., Strable J., Shimizu R., Koenig D., Sinha N., Scanlon M.J. (2010) WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol.*, 152: 1346-1356.

- Jiang K., Pi Y., Hou R., Jiang L., Sun X., Tang K. (2009) Promotion of nicotine biosynthesis in transgenic tobacco by overexpressing allene oxide cyclase from *Hyoscyamus niger*. *Planta*, 229(5): 1057-1063.
- Jin Y., Ni D.-A., Ruan Y.-L. (2009) Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell*, 21: 2072-2089.
- Kagan R.M., Clarke S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310: 417-427.
- Karuppusamy S. (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plants Res.*, 3(13): 1222-1239.
- Kaup O., Gräfen I., Zellermann E.-M., Eichenlaub R., Gartemann K.-H. (2005) Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *MPMI*, 18(10): 1090-1098.
- Keren H., Lev-Maor G., Ast G. (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat. Rev. Genet.*, 11: 345-355.
- Kerényi Z., Mérai Z., Hiripi L., Benkovics A., Gyula P., Lacomme C., Barta E., Nagy F., Silhavy D. (2008) Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO Journal*, 27: 1585 - 1595.
- Kim S.G., Kim S.T., Wang Y., Kim S.K., Lee C.H., Kim K.K., Kim J.K., Lee S.Y., Kang K.Y. (2010) Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiol. Plantarum*, 138: 1-9.
- Kliebenstein D.J. (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell & Environ.*, 27(6): 675-684.
- Kolewe M.E., Gaurav V., Roberts S.C. (2008) Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharmaceutics*, 5(2): 243-256.
- Kordali S., Cakir A., Akcin T.A., Mete E., Akcin A., Aydin T., Kilic H. (2009) Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Ind. Crop. Prod.*, 29: 562-570.
- Kozukue N., Friedman M. (2003) Tomatine, chlorophyll,  $\beta$ -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation. *J. Sci. Food. Agric.*, 83:195-200.
- Kozukue N., Han J.S., Lee K.R., Friedman M. (2004) Dehydrotomatine and  $\alpha$ -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J. Agric. Food Chem.*, 52(7): 2079 -2083.
- Kuhn R., Low I., Trischmann H. (1956) The constitution of tomatine. *Angew. Chem.*, 68, 212.
- Kusaba M. (2004) RNA interference in crop plants. *Curr. Opin. Biotech.*, 15: 139-143.
- Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (1998)  $\beta$ -amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.*, 256: 238-244.
- Kwon S.H., Lee B.H., Kim E.Y., Seo Y.S., Lee S., Kim W.T., Song J.T., Kim J.H. (2009) Overexpression of a *Brassica rapa* NGATHA gene in *Arabidopsis thaliana* negatively affects cell proliferation during lateral organ and root growth. *Plant Cell Physiol.*, 50(12): 2162-2173.
- Lairini K., Perez-Espinosa A., Pineda M., Ruiz-Rubio M. (1996) Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(5): 1604-1609.
- Langenheim J.H. (1994) Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, 20(6): 1223-1280.
- Lareau L.F., Brooks A.N., Soergel D.A., Meng Q., Brenner S.E. (2007) The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 623: 190-211.
- Lee S.E., Parka B.S., Kim M.K., Choi W.S., Kim H.T., Cho K.Y., Lee S.G., Lee H.S. (2001) Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Prot.*, 20(6): 523-528.

- Lee S.T., Wong P.F., Cheah S.C., Mustafa M.R. (2011) Alpha-tomatine induces apoptosis and inhibits nuclear factor-Kappa B activation on human prostatic adenocarcinoma PC-3 cells. *PloS one*, 6(4): 1-14.
- Leonardi C., Ambrosino P., Esposito F., Fogliano V. (2000) Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 4723-4727.
- Lessard P.A., Kulaveerasingam H., York G.M., Strong A., Sinskey A.J. (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab. Eng.*, 4(1): 67-79.
- Liepmann A.H., Wightman R., Geshi N., Turner S.R., Vibe Scheller H. (2010) Arabidopsis – a powerful model system for plant cell wall research. *Plant J.*, 61: 1107-1121.
- Lin F., Zhang Y., Jiang M.Y. (2009) Alternative splicing and differential expression of two transcripts of nicotine adenine dinucleotide phosphate oxidase B gene from *Zea mays*. *J. Integr. Plant Biol.*, 51(3): 287-298.
- López-Gresa M.P., Maltese F., Bellés J.M., Conejero V., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. (2010) Metabolic response of tomato leaves upon different plant–pathogen interactions. *Phytochem. Analysis*, 21: 89-94.
- Lukasik J., Bradley M.L., Scott T.M., Hsu W.Y., Farrah S.R., Tamplin M.L. (2001) Elution, detection, and quantification of polio I, bacteriophages, *Salmonella montevideo*, and *Escherichia coli* O157:H7 from seeded strawberries and tomatoes. *J. Food Prot.*, 64: 292-297.
- Ma X., Wang Z. (2009) Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov. Today*, 14(23-24):1136-1142.
- Manichaikul A., Ghamisari L., Hom E.F.Y., Lin C., Murray R.R., Chang R.L., Balaji S., Hao T., Shen Y., Chavali A.K., Thiele I., Yang X., Fan C., Mello E., Hill D.E., Vidal M., Salehi-Ashtiani K., Papin J.A. (2009) Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. *Nat. Methods*, 6: 589-592.
- Martin-Smith M., Sugrue M.F. (1964) Biological activity in steroids possessing nitrogen atoms: recent advances. *J. Pharm. Pharmacol.*, 16(9): 569-595.
- Matzke M., Kanno T., Daxinger L., Huettel B., Matzke Antonius J.M. (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 21(3): 367-376.
- McDowell E.T., Kapteyn J., Schmidt A., Li C., Kang J.H., Descour A., Shi F., Larson M., Schillmiller A., An L., Jones A.D., Pichersky E., Soderlund C.A., Gang D.R. (2011) Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. *Plant Physiol.*, 155: 524-539.
- McGinnis K. (2010) RNAi for functional genomics in plants. *Brief. Funct. Genomics*, 9(2): 111-117.
- McGinnis K., Chandler V., Cone K., Kaeppler H., Kaeppler S., Kerschen A., Pikaard C., Richards E., Sidorenko L., Smith T., Springer N., Wulan T. (2005) Transgene-induced RNA interference as a tool for plant functional genomics. *Methods Enzymol.*, 392, 1-24.
- Milla P., Viola F., Oliaro Bosso S., Rocco F., Cattel L., Joubert B.M., LeClair R.J., Matsuda S.P.T., Balliano G. (2002) Subcellular localization of oxidosqualene cyclases from *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma cruzi*, and *Pneumocystis carinii* expressed in yeast. *Lipids*, 37: 1171-1176.
- Mintz-Oron S., Mandel T., Rogachev I., Feldberg L., Lotan O., Yativ M., Wang Z., Jetter R., Venger I., Adato A., Aharoni A. (2008) Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiol.*, 147: 823-851.
- Morandini P., Salamini F. (2003) Plant biotechnology and breeding: allied for years to come. *Trends Plant Sci.*, 8(2): 70-75.
- Morikawa T., Mizutani M., Aoki N., Watanabe B., Saga H., Saito S., Oikawa A., Suzuki H., Sakurai N., Shibata D., Wadano A., Sakata K., Ohtaa D. (2006) Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato. *The Plant Cell*, 18:1008-1022.

- Morrissey J.P. (2009) Biological activity of defence-related plant secondary metabolites. *Plant-derived Nat. Prod.*, 3: 283-299.
- Mounet F., Moing A., Garcia V., Petit J., Maucourt M., Deborde C., Bernillon S., Le Gall G., Colquhoun I., Defernez M., Giraudel J.L., Rolin D., Rothan C., Lemaire-Chamley M. (2009) Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiol.*, 149: 1505-1528.
- Mugford S.G., Yoshimoto N., Reichelt M., Wirtz M., Hill L., Mugford S.T., Nakazato Y., Noji M., Takahashi H., Kramell R., Gigolashvili T., Flugge U.I., Wasternack C., Gershenzon J., Hell R., Saito K., Kopriva S. (2009) Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *The Plant Cell*, 21: 910-927.
- Mulatu B., Applebaum S.W., Kerem Z., Coll M. (2006) Tomato fruit size, maturity and alpha-tomatine content influence the performance of larvae of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bull. Entomol. Res.*, 96(2): 173-178.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.
- Neelakandan A.K., Song Z., Wang J., Richards M.H., Wu X., Valliyodan B., Nguyen H.T., Nes W.D. (2009) Cloning, functional expression and phylogenetic analysis of plant sterol 24C-methyltransferases involved in sitosterol biosynthesis. *Phytochemistry*, 70: 1982-1998.
- Nelson D.R., Schuler M.A., Paquette S.M., Werck-Reichhart D., Bak S. (2004) Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 Cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.*, 135: 756-772.
- Nes W.D. (2000) Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1529: 63-88.
- Nes W.D., Janssen G.G., Bergenstrah A. (1991) Structural requirements for transformation of substrates by the (S)-Adenosyl-methionine:  $\Delta 24$ -(25) -sterol methyl transferase. *J. Biol. Chem.*, 266(23): 15202-15212.
- Newman D.J., Cragg G.M. (2008) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70: 461-477.
- O'Brien M., Chantha S.C., Rahier A., Matton D.P. (2005) Lipid signaling in plants. Cloning and expression analysis of the obtusifoliosol 14 $\alpha$ -demethylase from *Solanum chacoense* Bitt., a pollination- and fertilization-induced gene with both obtusifoliosol and lanosterol demethylase activity. *Plant Physiol.*, 139: 734-749.
- Ohno I., Tomizawa M., Durkin K.A., Naruse Y., Casida J.E., Kagabu S. (2009) Molecular features of neonicotinoid pharmacophore variants interacting with the insect nicotinic receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(3): 476-482.
- Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Saito K., Muranaka T. (2008) Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *PNAS*, 106(3): 725-730.
- Oksman-Caldentey K., Inzè D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.*, 9: 433-440.
- Osabe K., Mudge S.R., Graham M.W., Birch R.G. (2009) RNAi mediated down-regulation of PDS gene expression in sugarcane (*Saccharum*), a highly polyploid crop. *Tropical Plant Biol.*, 2:143-148.
- Osbourn A.E. (2003) Saponin in cereals. *Phytochemistry*, 6: 1-4.
- Palusa S.G., Ali G.S., Reddy A.S. (2007) Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant J.*, 49: 1091-1107.
- Pascal S., Taton M., Rahier A. (1994) Plant sterol biosynthesis: identification of a NADPH dependent plant sterone reductase involved in the sterol-4-demethylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 312: 260-271.

- Pingulkar K., Kamat A., Bongirwar D. (2001) Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52: 15-23.
- Prakash G., Bhojwani S.S., Srivastava A.K. (2002) Production of Azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 7: 185-193.
- Price K.R., Johnson I.T., Fenwick G.R. (1987) The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 26(1): 127-135.
- Quidde T., Osbourn A.E., Tudzynska P. (1998) Detoxification of  $\alpha$ -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 52(3): 151-165.
- Rahier A. (2010) Dissecting the sterol C-4 demethylation process in higher plants. From structures and genes to catalytic mechanism. *Steroids*, 7(4): 340-352.
- Rahier A., Taton M. (1986) The 14 $\alpha$ -demethylation of obtusifoliol by a cytochrome P-450 monooxygenase from higher plants microsomes. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 140(3): 1064-1072.
- Rahier A., Taton M., Benveniste P. (1989) Cycloeucalenol-obtusifoliol isomerase. Structural requirements for substrates and inhibitors binding or transformation. *Eur. J. Biochem.*, 181: 615-626.
- Rattan R.S. (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.*, 29(9): 913-920.
- Rees H.H., Goad L.J., Goodwin T.W. (1968) Studies in Phytosterol Biosynthesis. Mechanism of biosynthesis of cicloartenol. *Biochem. J.*, 107: 417-427.
- Rick C.M., Uhlig J.W., Jones A.D. (1994) High  $\alpha$ -tomatine content in ripe fruit of Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: developmental and genetic aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 12877-12881.
- Robinson T. (1974) Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, 184: 430-435.
- Rocchi V., Janni M., Bellincampi D., Giardina T., D'Ovidio R. (2011) Intron retention regulates the expression of pectin methyl esterase inhibitor (Pmei) genes during wheat growth and development. In: *Plant Biol.*, (Ed: R. Mendel), German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands, pp: 1-9.
- Roddick J.G. (1976) Intracellular distribution of the steroidal glycoalkaloid  $\alpha$ -tomatine in *Lycopersicon esculentum* fruit. *Phytochemistry*, 15(4): 475-477.
- Roldán-Arjona T., Pérez-Espinosa A., Ruiz-Rubio M. (1999) Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12(10): 852-861.
- Ruiz-Rubio M., Pérez-Espinosa A., Lairini K., Roldan-Arjona T., Dipietro A., Anaya N. (2001) Metabolism of the tomato saponin  $\alpha$ -tomatine by phytopathogenic fungi. *St. Nat. Prod. Chem.*, 25(6): 293-326.
- Salunke B.K., Prakash K., Vishwakarma K.S., Maheshwari V.L. (2009) Plant metabolites: an alternative and sustainable approach towards post harvest pest management in pulses. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15(3): 185-197.
- Sandrock R.W., Della Penna D., Van Etten H.D. (1995) Purification and characterization of beta 2-tomatinase, an enzyme involved in the degradation of alpha-tomatine and isolation of the gene encoding beta 2-tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8(6): 960-970.
- SAS Institute Inc., Carey, North Carolina SAS JMP. 2006. JMP version 6.0.3.
- Schaller H. (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.*, 42: 163-175.
- Schauer N., Zamir D., Fernie A.R. (2004) Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J. Exp. Bot.*, 56(410): 297-307.
- Schauer N., Zamir D., Fernie A.R. (2005) Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J. Exp. Bot.*, 56: 297-307.



- Scholz M., Lipinski M., Leupold M., Luftmann H., Harig L., Ofir R., Fischer R., Prüfer D., Müller K.J. (2009) Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 70(4): 517-522.
- Schreiber G., Reuveni M., Evenor D., Oren-Shamir M., Ovadia R., Sapir-Mir M., Bootbool-Man A., Nahon S., Shlomo H., Chen L., Levin I. (2011) ANTHOCYANIN1 from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the ANTHOCYANIN FRUIT phenotype of tomato. *Theor. Appl. Genet.*, DOI: 10.1007/s00122-011-1705-6.
- Schrack K., Fujioka S., Takatsuto S., Stierhof Y.D., Stransky H., Yoshida S., Jürgens, G. (2004) A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 38: 227-243.
- Schrack K., Mayer U., Horrichs A., Kuhnt C., Bellini C., Dangl J., Schmidt J., Gerd J. (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.*, 14: 1471-1484.
- Serra O., Soler M., Hohn C., Franke R., Schreiber L., Prat S., Molinas M., Figueras M. (2009) Silencing of StKCS6 in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration. *J. Exp. Bot.*, 60(2): 697-707.
- Shabani L., Ehsanpour A.A., Asghari G., Emami J. (2009) Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. *Russian J. Plant Physiol.*, 56(5): 621-626.
- Sharma A.K., Sharma M.K. (2009) Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Adv.*, 27(6): 811-832.
- Shi J., Gonzales R.A., Bhattacharyya M.K. (1996) Identification and Characterization of an S-Adenosyl-L-methionine:  $\Delta$ 24-sterol-C-methyltransferase cDNA from soybean. *J. Biol. Chem.*, 71(16): 9384-9389.
- Shieh J.M., Cheng T.H., Shi M.D., Wu P.F., Chen Y., Ko S.C., Shih Y.W. (2011)  $\alpha$ -tomatine suppresses invasion and migration of human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through inactivating FAK/PI3K/Akt signaling pathway and reducing binding activity of NF- $\kappa$ B. *Cell Biochem. Biophys.*, 60: 297-310.
- Shinde A.N., Malpathak N., Fulzele D.P. (2009) Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. *Bioresource Technol.*, 100(5): 1833-1839.
- Smetanska I. (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, 111: 187-228.
- Staiger D., Zecca L., Wiczorek Kirk D.A., Apel K., Eckstein L. (2003) The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.*, 33(2): 361-371.
- Stapleton A., Allen P.V., Friedman M., Belknap W.R. (1991) Purification and characterization of solanidine glucosyltransferase from the potato (*Solanum tuberosum*). *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1187-1203.
- Stine K.J., Hercules R.K., Duff J.D., Walker B.W. (2006) Interaction of the glycoalkaloid tomatine with DMPC and sterol monolayers studied by surface pressure measurements and brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem.*, 110(44): 22220-22229.
- Suzuki M., Xiang T., Ohyama K., Seki H., Saito K., Muranaka T., Hayashi H., Katsube Y., Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (2006) Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.*, 47(5): 565-571.
- Tanabe N., Yoshimura K., Kimura A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2006) Differential expression of alternatively spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol.*, 48(7): 1036-1049.

- Taton M., Benveniste P., Rahier A. (1989) Microsomal delta 8,14-sterol delta 14-reductase in higher plants. Characterization and inhibition by analogues of a presumptive carbocationic intermediate of the reduction reaction. *Eur. J. Biochem.*, 185: 605-614.
- Thakore Y. (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.*, 2(3): 194-208.
- Theis N., Lerdau M. (2003) The evolution of function in plant secondary metabolites. *Intern. J. Plant Sci.*, 164: 93-102.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Tripathi P., Dubey N.K., Shukla A.K. (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 39-46.
- Van der Rest B., Danoun S., Boudet A.M., Rochange S.F. (2006) Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *J. Exp. Bot.*, 57(6): 1399-1411.
- Venkatramesh M., Guo D.A., Jia Z., Nes W.D. (1996) Mechanism and structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosyl-L-methionine:delta 24(25)-sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299(3): 313-324.
- Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretschmar G., Panopoulos N. (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.*, 2(10): 1214-1234.
- Voinnet O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136: 669-687.
- Vrebalov J., Pan I.L., Matas Arroyo A.J., McQuinn R., Chung M., Poolen M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J., Irish V.F. (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *The Plant Cell.*, 21: 3041-3062.
- Walsh G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotechnol.*, 28(9): 917-924.
- Wang B.B., Brendel V. (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *PNAS*, 103(18): 7175-7180.
- Wang L., Wang Z., Xu Y., Joo S.H., Kim S.K., Xue Z., Xu Z., Wang Z., Chong K. (2009) OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *Plant J.*, 57: 498-510.
- Whitaker D., Gapper N.E. (2008) Ripening-specific stigmaterol increase in tomato fruit is associated with increased sterol C-22 desaturase (CYP710A11) gene expression. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 3828-3835.
- Wilkins C., Dishongh R., Moore S.C., Whitt M.A., Chow M., Machaca K. (2005) RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436: 1044-1047.
- Williams H.D., Stone M.J., Hauck P.R., Rahman S.K. (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.*, 52(6): 1189-1208.
- Willker W., Leibfritz D. (1992) Complete assignment and conformational studies of tomatine and tomatidine. *Magn. Reson. Chem.*, 30: 645-650.
- Wink M. (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 225-233.
- Wu S., Chappell J. (2008) Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19(15): 145-152.
- Yanggen D., Cole D.C., Crissman C., Sherwood S. (2004) Pesticide use in commercial potato production: reflections on research and intervention efforts towards greater ecosystem health in northern. Ecuador. *EcoHealth*, 1: 72-83.
- Yendo A.C.A., de Costa F., Gosmann G., Fett-Neto A.G. (2010) Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. *Mol. Biotechnol.*, 46(1): 94-104.

- Zanor M.I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Wilfrid Bleiss C.K., Giavalisco P., Willmitzer L., Sulpice R., Zhou Y.H., Fernie A.R. (2009) RNA interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility. *Plant Physiol.*, 150: 1204-1218.
- Zhai Z., Sooksa-nguan T., Vatamaniuk O.K. (2009) Establishing RNA Interference as a reverse-genetic approach for gene functional analysis in protoplasts. *Plant Physiol.*, 149: 642-652.
- Zhong R., Ye Z.H. (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behav.*, 4(11): 1028-1034.
- Zhou M.L., Shao J.R., Tang Y.X. (2009) Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 52(4): 313-323.
- Zhu C., Naqvi S., Capell T., Christou P. (2009) Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 483(2): 182-190.